

Potencial terapéutico de una formulación liposomal de N-acetilcisteína en modelos murinos de enfermedades respiratorias

Morales Estefanía Nicole

Director: Dr. Ignacio Fenoy

Co-directora: Dra. Nadia Chiaramoni

UNSAM

2023

ITECA_ECyT_UNSAM-CONICET

Agradecimientos

Recibirme para mí representa cerrar una etapa de mi vida, con subidas y bajadas pero si hago un balance con más alegrías y sonrisas que malos momentos y eso es solo posible gracias a las hermosas personas que me acompañaron en este trayecto. Así que dedico estas palabras a todas aquellas personas que hicieron este trayecto más lindo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis viejos, por ser incondicionales y festejar cada pequeño logro como si hubiera ganado un Nobel. Papá me enseñaste muchas cosas pero una de las más importantes cosas, es que me enseñaste a trabajar duro por alcanzar tus metas y sueños, que el trabajo dignifica como vos dirías y lo mejor es que me enseñaste con el ejemplo. Mamá, sos una mujer luchadora, la vida te puso obstáculos y vos nunca te dejaste vencer, me siento super orgullosa de ser tu hija. Todo lo que soy se lo debo a ustedes, gracias por darme tanto amor.

Quiero agradecer a mis abuelos, gracias por preocuparse por mí, cuidarme y siempre estar orgullosos de mí. Papa Rodo, lamentablemente la vida nos privó de compartir este momento juntos, pero siempre van a estar en mis recuerdos todos los abrazos que me diste. También quiero agradecer a mis tíos (Tania, Yerko y Juan) gracias por cada palabra de aliento y mis primos (Nahuel y Bianca) me siento orgullosa de las buenas personas que son, gracias por siempre estar.

Quiero agradecer a Nach, mi director, sos una persona incomparable, gracias por volver cada momento en un mar de risas, por motivarme aun cuando los resultados no daban bien, gracias por estar siempre presente con ideas nuevas. Te admiro como investigador y como persona. Es y será un placer trabajar con vos.

Quiero agradecer a Nadia, mi co-directora, por la buena onda y todas las correcciones que me sirvieron para mejorar.

Agradezco a mis compañeros de labo (Coty, Tade, Joel, Juli, Vicky, Fede, Eze, Guido, Tati, Facu, Ivana) e investigadores (Ale, Valen , Ale M, Vane, Paco, Nadia). Gracias Alejandra por estar siempre pendiente de mí y de todos en el lab, Vane por siempre caer con una sonrisa, Tade por hacerme reír con tus brotes psicóticos, Guido por ser mi compañero de laboratorio. Ivana, nuestra técnica bioterista, por la asistencia con los animales. Podría nombrar algo de cada uno pero todo se resume en gracias por hacer un ambiente de trabajo hermoso y ayudarme siempre ante cualquier duda o situación que tenía.

Por último, quiero agradecer a Diego Lamas, director del ITECA, por la asistencia en las mediciones con el equipo SAXS de las partículas liposomales.

Quiero Agradecer a mis amigos y compañeros:

La vida no me dio hermanas pero me dio unas amigas incondicionales, Aylene y Eve, nos conocemos desde pequeñas, nos graduamos de primaria juntas y ahora estamos haciendo nuestro lugar en el mundo. Gracias por estar conmigo.

Tom, Edu, Sol, Jaxi, Gaby nos conocimos en la facultad y la locura nos unió como grupo de amigos. Gracias por estar en las buenas pero sobre todo por estar en malas, los quiero mucho.

A mis amigos de la universidad (Sol, Mar, Yasi, Franco, Fede y tantos otros más) les agradezco cada mate, cada tarde de estudio. Por hacer que de la universidad no solo me lleve conocimientos sino también buenos amigos.

A mis amigos (Pablo, Mely, Agus, Mely C, Sol) de la secundaria, nunca se aprendieron bien el nombre de mi carrera, pero siempre me alentaron para seguir adelante.

Resumen

En los últimos años, se ha observado un aumento exponencial en la incidencia de enfermedades respiratorias crónicas a nivel global. Este incremento se ha relacionado con el aumento de la contaminación atmosférica y con los cambios propios de la vida moderna. En particular, el presente estudio se enfoca en el tratamiento de dos enfermedades respiratorias específicas como son el asma y la fibrosis pulmonar idiopática. El asma es una patología que se caracteriza por la inflamación crónica y la hiperreactividad de las vías respiratorias, ambos procesos orquestados por linfocitos Th2. Por otro lado, la fibrosis pulmonar es una enfermedad crónica y progresiva que se distingue por la acumulación de matriz extracelular en los pulmones lo que produce una cicatrización crónica y un engrosamiento del tejido que rodea los alvéolos. Debido a que ambas condiciones son multifactoriales y crónicas, actualmente no existe cura para estas enfermedades. Por consiguiente, los tratamientos actuales se enfocan en controlar los síntomas y preservar la función pulmonar.

La N-acetilcisteína (NAC), es un compuesto con actividad antioxidante, antiinflamatoria y mucolítica (Dekhuijzen, 2004). Todas estas propiedades la convierten en una excelente opción para el tratamiento de enfermedades respiratorias. El principal problema de este fármaco es su baja biodisponibilidad. Entonces, el desarrollo de estrategias de *delivery* para transportar y estabilizar la NAC tiene potencial como estrategia para aumentar su biodisponibilidad.

Los liposomas son bicapas de fosfolípidos biocompatibles y no inmunogénicos. Son unas de las estrategias más prometedoras de *delivery* de fármacos debido a que logran un direccionamiento selectivo asegurando la estabilidad de la droga con una liberación controlada. Además, son seguros por lo que ya se los emplea en la clínica.

El surfactante pulmonar es un agente tensioactivo natural producido por el epitelio alveolar compuesto principalmente por proteínas y fosfolípidos. Estos fosfolípidos resultan en una opción ideal para la generación de liposomas.

Por lo expuesto, en este trabajo nos proponemos evaluar la hipótesis de que el uso de liposomas generados con fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar funcionan como sistema de *delivery* de NAC potenciando su actividad mucolítica, antiinflamatoria y antioxidante para su aplicación como tratamiento contra enfermedades respiratorias como el asma y la fibrosis.

Se empleó un modelo murino de asma experimental ampliamente utilizado en la bibliografía. El cual consiste en dos inoculaciones con OVA/Aluminio vía intraperitoneal. Luego, se realizaron desafíos por vía aérea con OVA al 3% por 3 días consecutivos. Se diseñó un esquema de administración terapéutico de los tratamientos para evaluar el potencial mucolítico y antiinflamatorio de la NAC.

Al evaluar la respuesta inmune sistémica mediante un cultivo *ex vivo* de esplenócitos, la formulación liposomal de NAC fue la única que logró disminuir significativamente ambas respuestas (Th1 y Th2). Además, se evaluó la inflamación pulmonar mediante cortes histológicos. Solo se registró una disminución significativa del infiltrado celular con el tratamiento con la formulación liposomal. Además, esta formulación fue la única en lograr una disminución significativa del depósito de mucus en el pulmón respecto al control asmático. Estos resultados indicarían que el *delivery* de NAC a base de liposomas, potenciaría la actividad antiinflamatoria y mucolítica de la NAC.

Como segundo objetivo de este trabajo se estableció un modelo murino de inducción de fibrosis pulmonar vía administración de bleomicina para el estudio del potencial antioxidante de la NAC. Se logró establecer con éxito este modelo experimental que permitió reproducir varios indicadores de la patología humana. Al evaluar la formulación liposomal de NAC en este modelo, se pudo observar un patrón histológico característico de la fibrosis pulmonar con cicatrización destructiva, el tratamiento con la formulación liposomal logró reducir la gravedad de la fibrosis y el depósito de colágeno en los pulmones de manera similar a la observada con el tratamiento con NAC. La formulación liposomal también demostró reducir significativamente los niveles de TGF- β , un mediador maestro de la fibrosis pulmonar, por lo que su evaluación como tratamiento para la fibrosis pulmonar es prometedora. Por último, la formulación liposomal demostró incrementar el potencial antioxidante de NAC, ya que fue la única que mostró una reducción significativa de los niveles de mieloperoxidasa en lavados bronquioalveolares y lactato deshidrogenasa sérica, indicadores de lesión pulmonar.

En conjunto, estos hallazgos evidencian el potencial de la formulación liposomal para incrementar la capacidad mucolítico, antiinflamatorio y antioxidante de la NAC.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	4
Índice	6
Siglas	9
Introducción	10
1. Enfermedades respiratorias crónicas	10
1.1 Definición e incidencia	10
1.2 Asma	11
1.2.1 Mecanismos celulares	11
1.2.2 Inicio y sensibilización alérgica	11
1.2.3 Tratamientos	13
1.2.3.1 Esteroides	13
1.2.3.2 Agonistas β_2 de acción prolongada	13
1.2.3.3 Antagonistas de los receptores de leucotrienos	13
1.2.3.4 Antihistamínicos y Antialérgicos	14
1.2.3.5 Terapia con biosimilares	14
1.3 Fibrosis	15
1.3.1 Patogénesis de la fibrosis pulmonar	15
1.3.2 Diagnóstico	16
1.3.3 Tratamiento	17
1.3.3.1 Medicamentos	17
1.3.4 Modelos murinos de fibrosis pulmonar	18
2. N-acetilcisteína	19
2.1 Múltiples aplicaciones clínicas	20
2.1.1 Enfermedades respiratorias	20
2.2 Administración y farmacocinética	21
3. Sistemas de delivery	21
3.1 Liposomas	22
3.1.1 Aplicaciones clínicas de los liposomas	23
3.1.1.1 Aplicaciones clínicas en enfermedades respiratorias	23
3.1.1.2 Surfactante pulmonar	24
3.1.1.3 Formulaciones liposomas con N-acetilcisteína	24
Hipótesis	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
Metodología	27
1. Síntesis de liposomas	27
2. Diseño experimental y análisis estadístico	27
3. Modelo experimental asma	27

3.1	Animales	27
3.2	Modelo de asma y esquema de administración de tratamientos	28
3.3	Análisis del fenotipo asmático	29
3.3.1	Lavado broncoalveolar y conteo celular diferencial	29
3.3.2	Cultivo celular	29
3.3.3	Histopatología	29
3.3.4	Medición de anticuerpos en suero	30
3.3.4.1	Medición de IgE	30
3.3.4.2	Medición de IgG1 e IgG2a	30
3.3.5	Medición de citoquinas	30
4.	Modelo Fibrosis	31
4.1	Animales	31
4.2	Modelo de inducción de fibrosis pulmonar	31
4.3	Evaluación del fenotipo fibrótico	32
4.3.1	Estado general de los animales: Peso y comportamiento por ensayo de Open field	32
4.3.2	Lavado broncoalveolar y conteo celular diferencial	33
4.3.3	Cultivo celular	33
4.3.4	Extracción de proteínas pulmonares	33
4.3.5	Histopatología	33
4.3.6	Medición de marcadores de fibrosis pulmonar	35
4.3.6.1	Medición de proteínas totales en BAL	35
4.3.6.2	Medición de mieloperoxidasa en BAL	35
4.3.7.3	Medición de Lactato deshidrogenasa en suero	35
4.3.8	Medición de citoquinas	35
	Resultados	36
1.	Asma atópica	36
1.1	Modelo de asma murino	36
1.1.1	Selección de la concentración de la NAC	36
1.2	Protocolo experimental	37
1.3	Análisis del fenotipo asmático	37
1.3.1	Células en BAL	37
1.3.2	Anticuerpos séricos específicos para el alérgeno	38
1.3.3	Perfil de expresión de citoquinas	38
1.3.3.1	Expresión de citoquinas a nivel local (pulmón)	38
1.3.3.2	Expresión de citoquinas a nivel sistémico	39
1.3.4	Histopatología pulmonar	41
2.	Modelo de Fibrosis	43
2.1	Protocolo experimental	43
2.1.1	Selección de concentración de BLM	44

2.2 Registro del bienestar de los ratones	45
2.3 Análisis del fenotipo fibrótico	46
2.3.1 Células en BAL	46
2.3.2 Cultivo de esplenocitos	47
2.3.3 Histología pulmonar	48
2.3.4 Medición de indicadores de daño pulmonar y marcadores fibróticos	52
Discusión	54
Conclusiones	62
Primer objetivo:	62
Segundo Objetivo:	62
Bibliografía	63

Siglas

- BAL: Lavado broncoalveolar (por sus siglas en inglés)
- BLM: Bleomicina
- CH: Quitosano
- Con A: Concanavalina A
- DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
- ERC: Enfermedades respiratorias crónicas
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU
- FPI: Fibrosis pulmonar idiopática
- FVC: Capacidad vital forzada vital
- GINA: Programa Iniciativa Global para el Asma
- GSH: Glutación reducido
- Hox: Ácidos hipohalosos
- ICS: Corticosteroides inhalados
- ILC2: Célula linfoide innata de tipo 2
- IT: Intratraqueal
- LABA: Agonistas beta de acción prolongada
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- Lip: Liposomas vacíos
- LUV: Vesícula unilaminar grande
- MPO: Mieloperoxidasa
- MEC: Matriz extracelular
- MLV: Vesícula multilaminar
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio
- NAC: N-acetilcisteína
- NAC-Lip: N-acetilcisteína/liposomas
- NIU: Neumonía intersticial habitual
- OA: Aspiración orofaríngea
- OVA: Ovoalbúmina
- PAS: *Periodic acid-Schiff* (por sus siglas en inglés)
- PMPC: palmitoil-miristoil-fosfatidilcolina
- POPC: palmitoil-palmitoleoil-fosfatidilcolina
- ROS: Especies reactivas derivadas del oxígeno
- SBS: Sulfato de salbutamol
- TMB: Tetrametilbencidina
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés)
- TSLP: linfopoyetina estromal tímica (por sus siglas en inglés)

Introducción

1. Enfermedades respiratorias crónicas

1.1 Definición e incidencia

Las enfermedades respiratorias crónicas (ERC) son un grupo de enfermedades que afectan el aparato respiratorio y pueden incluir trastornos como el asma, la enfermedad obstructiva pulmonar crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar idiopática (Shukla et al., 2020). Las ERC son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países subdesarrollados (Clark et al., 2022). Estas enfermedades tienen un gran impacto en la calidad de vida de las personas afectadas y en la de sus familiares, con consecuencias en la capacidad para realizar actividades cotidianas, y también representan un costo económico significativo para los sistemas de salud (Clark et al., 2022).

A lo largo de los años la incidencia de estas enfermedades ha ido en aumento. Si bien sus etiologías aún están en estudio, se cree que dicho aumento se relaciona con un incremento en la contaminación aérea, el tabaquismo y los cambios propios de la vida moderna (Boulet et al., 2019). Argentina no es una excepción a esta tendencia (Mazzeo, 2021). Las muertes por enfermedades respiratorias han escalado significativamente llegando a superar el 25% del total de las muertes registradas en la ciudad de Buenos Aires (Mazzeo, 2021).

El asma en particular es una de las enfermedades respiratorias crónicas más comunes en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. Según la guía elaborada por el Programa Iniciativa Global para el Asma (GINA), se estima que alrededor de 300 millones de personas en el mundo actualmente tienen asma y que este número aumentará en 100 millones de personas adicionales para 2025 (Boulet et al., 2019). En Argentina, el asma tiene una prevalencia de aproximadamente el 10% generando 400 muertes y 15.000 hospitalizaciones por año (Arias et al., 2018).

Por otro lado, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se considera una enfermedad crónica respiratoria poco común, aunque posee una frecuencia de ocurrencia similar a la de los cánceres de estómago, cerebro y testículo (Hutchinson et al., 2015). El término idiopática refiere a que aún se desconoce el origen de la enfermedad. Históricamente, se consideraba un trastorno inflamatorio crónico que progresaba gradualmente hacia el establecimiento de una fibrosis pero actualmente se cree que la enfermedad se produce como el resultado de la interacción entre varios factores de riesgo genéticos y ambientales. Principalmente, es producto de micro-lesiones locales repetitivas en el epitelio alveolar, lo que lleva a la activación de los fibroblastos y su diferenciación de miofibroblastos, generando un aumento del depósito de matriz extracelular (MEC) lo que resulta en la distorsión de la arquitectura pulmonar (Mei et al., 2022; Richeldi et al., 2017).

Normalmente, la FPI afecta a adultos de entre 50 y 70 años, con mayor susceptibilidad en hombres en comparación con mujeres. En particular, afecta en mayor grado a aquellos con antecedentes de tabaquismo. Al igual que las demás ERC, su incidencia se encuentra en un abrupto incremento. Se estima una prevalencia de entre 3 y 18 casos por cada 100.000 personas por año para Europa y América del Norte (Richeldi et al., 2017). Existe poca información disponible sobre la variación mundial, aun así

se estima que la incidencia podría ser más baja en Asia y América del Sur, donde oscila entre 0,5 y 4,2 casos por cada 100. 000 individuos por año (Richeldi et al., 2017).

1.2 Asma

El asma se caracteriza por una inflamación crónica de las vías aéreas, lo que provoca una respuesta exacerbada que conlleva la broncoconstricción frente a distintos estímulos. Esto ocurre debido a la remodelación de la estructura tisular, la liberación de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que inducen hiperplasia e hipertrofia de las células productoras de mucus, proliferación del músculo liso, formación de vasos sanguíneos y fibrosis subepitelial (Murdoch & Lloyd, 2010). Todo esto conlleva que las vías aéreas se vuelvan más sensibles a injurias ambientales, lo cual desencadena una respuesta exacerbada a numerosos estímulos endógenos o exógenos como son alérgenos, contaminantes ambientales, niveles elevados de ozono, virus o humo de cigarrillo, entre otros. La susceptibilidad a desarrollar asma depende tanto de factores genéticos como ambientales produciendo manifestaciones clínicas heterogéneas y variables en el tiempo. Entre los signos clínicos distintivos de esta condición se incluyen el volumen espiratorio forzado reducido, la tos crónica, la constricción de las vías respiratorias, disnea, hipoxia y sibilancias (Bush, 2019).

1.2.1 Mecanismos celulares

El asma es un trastorno inmunitario orquestado por linfocitos TCD4⁺ del subtipo Th2. Las células TCD4⁺ son heterogéneas y se pueden dividir en varios subtipos efectoros. Tres de los subtipos más comunes son las células Th1, Th2 y Th17. Estas diferentes subpoblaciones de células efectoras montan diferentes tipos de respuestas inmunes específicas para un tipo particular de patógeno. Las células Th2 son importantes a la hora de montar una respuesta frente a helmintos y procesos de reparación de tejidos. La patogénesis de esta enfermedad puede verse como un fenómeno de dos etapas. La primera consiste en la sensibilización al alérgeno seguida del direccionamiento de la inflamación alérgica hacia las vías aéreas inferiores (Paul & Zhu, 2010).

1.2.2 Inicio y sensibilización alérgica

Los alérgenos son sustancias inofensivas presentes en el medio ambiente capaces de desencadenar una respuesta inmune de tipo alérgica. Como mencionamos previamente, el asma alérgica se caracteriza por la presencia de células Th2 que desencadenan una respuesta adaptativa exacerbada contra alérgenos. La repetida exposición a estos antígenos amplifica y prolonga la inflamación alérgica, lo que causa la hiperreactividad de las vías respiratorias, siendo este el sello distintivo del asma (Paul & Zhu, 2010).

Durante la sensibilización inicial (figura 1), cuando ingresa un alérgeno, entra en contacto con la membrana de las células epiteliales y una vez que atraviesa dicha barrera, estas células secretan citoquinas como IL-33, IL-25 y linfopoyetina estromal tímica (por sus siglas en inglés TSLP) para inducir la diferenciación y activación de las células linfocíticas innatas de tipo 2 (ILC2). Luego de activarse, los ILC2 producen IL-5, IL-4 e IL-13, lo que va a determinar que las dendríticas en ausencia de citoquinas del tipo Th1 (IFN- γ e IL-12), adquieran la capacidad de diferenciar a los linfocitos a un perfil Th2 (Amsen et al., 2004). Las células dendríticas son las células nexo entre la inmunidad innata y adaptativa, estas células

captan al alérgeno y, en este contexto, maduran y migran a ganglio donde ocurrirá la presentación antigénica, activación y diferenciación de los linfocitos específicos contra el alérgeno con una polarización hacia un perfil Th2 mediada por la citoquina IL-4, lo que desencadena en más producción de IL-4 e IL-13, favoreciendo el reclutamiento de mastocitos y eosinófilos (Hammad & Lambrecht, 2015). Por otro lado, se produce la activación de los Th2 que son un grupo especializado de células TCD4⁺ que median la activación de linfocitos B específicos contra el alérgeno, producto de la IL-4 se induce un *switch* de isotipo a IgE. Esta inmunoglobulina es de los principales mediadores de la patología, la cual se une a receptor de alta afinidad (FcεRI) que se encuentra en la superficie de los mastocitos, basófilos y eosinófilos. Cuando se produce el segundo encuentro con el antígeno, los anticuerpos de tipo IgE unidos a los mastocitos, lo reconocen y se unen, como consecuencia se produce la activación de las células, generando la degranulación, lo que permite la liberación de citoquinas y factores inflamatorios como la histamina, que generan vasodilatación y contracción del músculo liso.

Todas estas poblaciones, junto con los linfocitos Th2 activados en ganglio se extravasan al pulmón donde secretan citoquinas, desencadenando diversos procesos como un incremento en la producción de mucus y un aumento en el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular, lo que favorece el reclutamiento de otras células del sistema inmune. A esta última etapa se la conoce como etapa de re-exposición. Los numerosos encuentros con el alérgeno llevan al establecimiento y mantenimiento de la inflamación alérgica hacia las vías aéreas inferiores (Holgate, 2008; Murdoch & Lloyd, 2010).

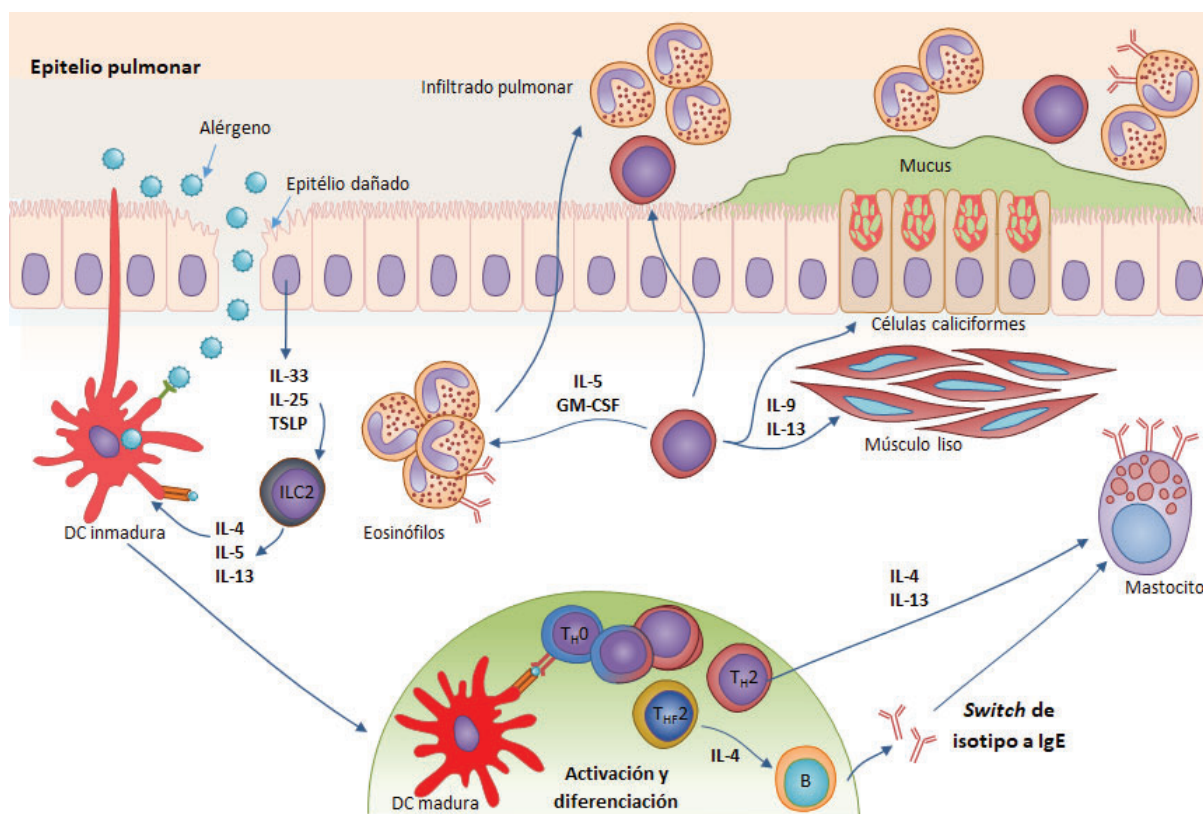


Figura 1: Esquema de la sensibilización inicial de las vías respiratorias en la inducción de asma alérgica.

1.2.3 Tratamientos

La desregulación del sistema inmune y los brotes producto de la hipersensibilización del asma lo convierte en una condición crónica multifactorial difícil de tratar y aparentemente imposible de curar (S. P. Peters et al., 2006). Por lo que los tratamientos actuales se centran en controlar los síntomas y preservar la función pulmonar.

El tratamiento de esta patología tiene un enfoque escalonado con un aumento gradual de dosis de estos medicamentos acorde a la gravedad de la enfermedad (S. P. Peters et al., 2006). Los pacientes con asma persistente grave mal controlada, además de necesitar medicamentos enfocados contra el asma, a menudo requieren medicamentos controladores adicionales (S. P. Peters et al., 2006).

1.2.3.1 Esteroides

Los corticosteroides inhalados (ICS), que tienen una función y estructura similar al cortisol, son el principal tratamiento contra el asma enfocado en aliviar y prevenir los síntomas mediante la supresión de las poblaciones celulares implicadas en la patogenia, tales como los eosinófilos, linfocitos T, mastocitos y las células dendríticas (Williams, 2018). Su unión específica al receptor de glucocorticoides reduce la activación de factores proinflamatorios como NF- κ B y MAPK (Newton, 2014). Aunque generalmente se los tolera bien, su uso prolongado y sostenido en el tiempo produce efectos secundarios relacionados con la supresión del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal, como la inhibición del crecimiento en los niños, el aumento del riesgo de osteoporosis, la inhibición suprarrenal y la diabetes (Rice et al., 2017). Esta clase de medicamentos generalmente se combina con un agente de acción prolongada para el mantenimiento del asma de gravedad baja a moderada.

1.2.3.2 Agonistas β_2 de acción prolongada

Los receptores β_2 -adrenérgicos que se encuentran en las vías respiratorias bronquiales son responsables de la broncoconstricción que se produce durante una crisis asmática. Entre los tratamientos que promueven la broncodilatación se encuentran los agonistas β_2 de acción prolongada (LABA) como el formoterol. Se ha reportado un efecto de sinergismo en la combinación de este tratamiento con los ICS disminuyendo la respuesta inflamatoria Th2 al suprimir el ARNm que codifica para TSLP en los bronquios (Harada et al., 2011). Sin embargo, en múltiples ensayos clínicos se reportaron efectos secundarios graves, como por ejemplo mayor riesgo de exacerbación e incluso la muerte (Korsgaard & Ledet, 2009). Por lo que una alternativa para el tratamiento de pacientes con cuadros de asma menos severos son los agonistas β_2 de acción corta (Xia et al., 2013).

1.2.3.3 Antagonistas de los receptores de leucotrienos

Los leucotrienos son mediadores de lípidos derivados del ácido araquidónico que generan inflamación durante las reacciones alérgicas, especialmente en casos de asma neutrofílica. Un ejemplo es el leucotrieno B₄, un mediador proinflamatorio que desencadena la degranulación de neutrófilos y eosinófilos presentes en el líquido broncoalveolar (Jo-Watanabe et al., 2019; Yokomizo et al., 2018). Los antagonistas de los receptores de leucotrienos como montelukast surgen como una terapia especialmente útil en niños, para los cuales no está recomendado el uso de ICS o casos de asma neutrofílica mal tratada (Xia et al., 2013).

1.2.3.4 Antihistamínicos y Antialérgicos

La histamina es una quimioquina liberada por los mastocitos activados luego del entrecruzamiento de las IgE de superficie. Dicha sustancia causa la contracción del músculo liso y el edema de la mucosa bronquial. El bloqueo de los receptores de histamina, pueden bajar la inflamación pulmonar y la secreción de moco al interrumpir la transducción de señales de histamina (Thangam et al., 2018; Yamauchi & Ogasawara, 2019). La loratadina o la cetirizina son antihistamínicos que han demostrado beneficios en estudios clínicos, si bien estos medicamentos se toleran bien como terapias complementarias, algunos antihistamínicos causan somnolencia y otros, como la terfenadina, se han asociado con arritmias cardíacas que pueden resultar incluso mortales por lo que están prohibidos en algunos países (McTavish et al., 1990; Menardo et al., 1997).

1.2.3.5 Terapia con biosimilares

Entre los tratamientos más actuales se encuentran los tratamientos biológicos con anticuerpos monoclonales específicos para las citoquinas involucradas en la patogénesis del asma, o sus receptores. Estos reducen los efectos secundarios debido a su elevada especificidad. Diversos fármacos se encuentran en ensayos clínicos como el anticuerpo anti-TSLP (tezepelumab), anticuerpo anti-IL-33R (CNTO 7160) y el anticuerpo anti-IL-4R α (dupilumab). En el caso del anticuerpo anti-IL-5 (mepolizumab y reslizumab) fue aprobado como tratamiento para el asma grave por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA) (McGregor et al., 2019).

La IgE es un factor clave responsable de la desgranulación de basófilos y mastocitos. Se desarrollaron anticuerpos humanos anti-IgE (omalizumab) para prevenir la remodelación de las vías respiratorias observando supresión de las citocinas inflamatorias IL-6, IL-8, TNF- α e IL-4 (Hoshino & Ohtawa, 2012). Múltiples blancos se proponen actualmente para generar terapias biológicas, pero el principal problema de esta tecnología es el costo, además debido a la especificidad de la terapia se requiere un muestreo inicial de los pacientes.

1.3 Fibrosis

La fibrosis pulmonar es una enfermedad crónica y progresiva. Se han identificado varios factores de riesgo, incluyendo el tabaquismo (Baumgartner et al., 1997), así como también factores ocupacionales y ambientales. Se ha descrito que la exposición a largo plazo a ciertas toxinas y contaminantes puede dañar los pulmones. Tales factores incluyen la harina de sílice, las fibras de asbesto, el polvo de metales duros, entre otros (Hubbard, 2001). Además factores de riesgos adicionales incluyen infecciones virales crónicas, el reflujo gastroesofágico y la predisposición genética (Hodgson et al., 2002). La cual la fibrosis pulmonar también se puede dar como efecto secundario de la quimioterapia y la radioterapia, solas o combinadas, ya que estos tratamientos se asocian con toxicidad pulmonar clínicamente significativa. Esto finalmente resulta en lesiones pulmonares intersticiales con fibrosis pulmonar como secuela (Abid et al., 2001). Muchos procesos moleculares, genéticos y celulares son compartidos entre la fibrosis pulmonar y el cáncer de pulmón, como por ejemplo la activación y proliferación incontrolada de miofibroblastos, el estrés del retículo endoplásmico, las alteraciones en la expresión de factores de crecimiento y el estrés oxidativo. Por esto, muchas mutaciones y cambios epigenéticos que se asocian con una mayor predisposición a desarrollar cáncer de pulmón también pueden predisponer al paciente a desarrollar fibrosis pulmonar idiopática como es el caso de la mutación del gen *fragile histidine triad* (Sozzi et al., 1996; Uematsu et al., 2001). Debido a esto, la fibrosis pulmonar idiopática en sí misma aumenta el riesgo de desarrollo de cáncer de pulmón de un 7% a un 20% (Ballester et al., 2019).

1.3.1 Patogénesis de la fibrosis pulmonar

Dado que en numerosos ensayos clínicos se han ensayado terapias inmunológicas con biosimilares, como el tratamiento con IFN- γ o la neutralización de TNF- α , y no se han demostrado efectos positivos sobre la progresión de la enfermedad, y en algunos casos incluso se ha reportado un empeoramiento de los síntomas en comparación con los pacientes tratados con placebo (King et al., 2009; Raghu et al., 2008), se descartó la hipótesis inflamatoria como origen de la patología. Sin embargo, el fracaso de los ensayos clínicos no implica que el sistema inmune no tenga un papel importante en la FPI y sea irrelevante para la etiología o el tratamiento de esta enfermedad.

Un enfoque para comprender la patogenia de la FPI que actualmente está cobrando relevancia es considerarla como un proceso de tres etapas: predisposición, activación y progresión (Wolters et al., 2018). Los factores de riesgos mencionados anteriormente predisponen a un individuo a desarrollar fibrosis (Baumgartner et al., 1997; Hubbard, 2001). Estos factores finalmente conducen a la disfunción de las células epiteliales. Sin embargo, no necesariamente todos los individuos en esta etapa desarrollarán una enfermedad clínicamente relevante. La etapa inicial incluye procesos como la activación excesiva del TGF- β , el reclutamiento de fibrocitos y la transición epitelial mesenquimal. La etapa final o de progresión incluye procesos como la diferenciación patológica de fibroblastos a través de la activación de la vía del TGF- β , la deposición y remodelación de la matriz, y cambios epigenéticos profibróticos en fibroblastos y células epiteliales. Además, se produce la activación de células mesenquimales y la remodelación de la matriz (Kinoshita & Goto, 2019).

En la fase de progresión, la estructura alveolar normal del pulmón se pierde por completo y se reemplaza por tejido fibrótico remodelado caracterizado por espacios de aire, con un patrón estructural característico conocido como “panal de abejas” (Wolters et al., 2018).

Por último, esta patología se caracteriza por el incremento de los indicadores de lesión pulmonar durante el desarrollo de la enfermedad, como son un aumento en el estrés oxidativo y marcadores fibróticos como el TGF- β (Cantin et al., 1987).

1.3.2 Diagnóstico

La FPI es una enfermedad crónica y progresiva; ocurre principalmente en hombres mayores con una media en el momento del diagnóstico de unos 65 años (Mortimer et al., 2020). Esta patología ocasiona una disminución progresiva de la función pulmonar subjetiva hasta la muerte eventual por insuficiencia respiratoria o comorbilidad complicada. En general, los primeros síntomas son no específicos como disnea con o sin tos seca, por lo que comúnmente se los atribuye al envejecimiento u otras comorbilidades como por ejemplo antecedentes de tabaquismo, enfisema, enfermedad cardiovascular u obesidad. Esto retrasa el diagnóstico por lo que generalmente los pacientes se presentan en la etapa aguda de la enfermedad, con días o semanas de empeoramiento respiratorio, a menudo acompañado de fiebre y síntomas similares a los de la influenza. Estas exacerbaciones agudas requieren una distinción diagnóstica cuidadosa de otras formas de enfermedad pulmonar intersticial aguda (Richeldi et al., 2017).

La fibrosis pulmonar idiopática se diagnostica por identificación del patrón de la neumonía intersticial habitual (NIU) en pacientes mediante análisis histopatológico, radiológico y/o en tomografías computarizadas. Este patrón se caracteriza por la identificación de la estructura “panal de abeja” como se observa en la figura 2. Este criterio está respaldado por las guías de consenso por la *American Thoracic Society & European Respiratory Society*.

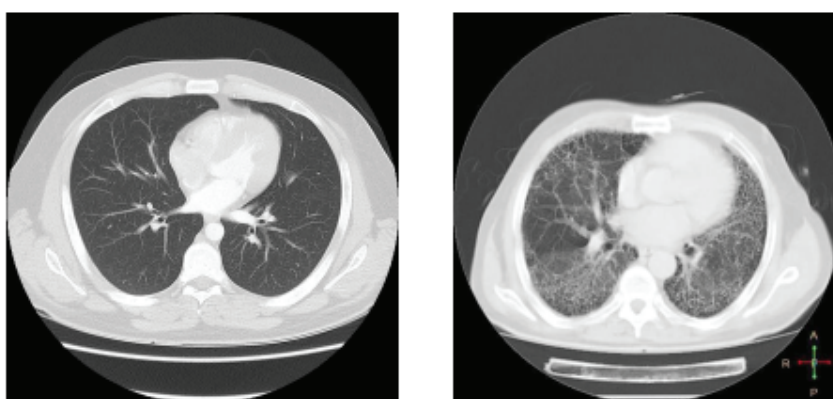


Figura 2: Imagen de tomografía computarizada de pulmones de un paciente sano (izquierda) y de un paciente con FPI (derecha), donde se puede observar la estructura del “panal de abeja” característica del patrón neumonía intersticial habitual (NIU). Imagen tomada de Diaz 2019 (Diaz et al., 2019).

Cuando se realiza un diagnóstico histológico del patrón de neumonía intersticial habitual, este se caracteriza por fibrosis intersticial con heterogeneidad espacial con parches en el parénquima pulmonar, distorsión arquitectónica y espacios aéreos císticos revestidos por epitelio bronquiolar típicamente llenos de mucina como se observa en la figura 3 (Raghu et al., 2011).

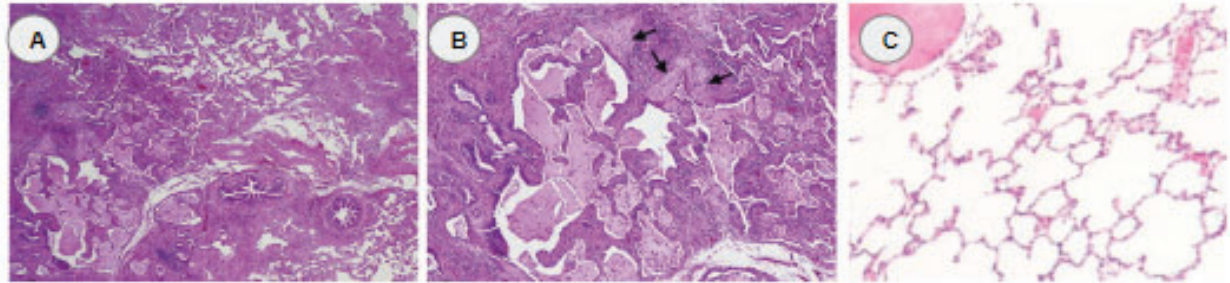


Figura 3: **A)** Histología de pulmones de pacientes con FPI, en un bajo aumento, donde se ilustra el patrón mosaico con estructura del panel de abeja (izquierda) y cicatrización del parénquima. **B)** Imagen con mayor aumento de la ilustrada en A, que muestra el exudado mucinoso, inflamación crónica y los focos de fibroblastos (flechas). Imágenes tomadas de Katzenstein et al 2008 (Katzenstein et al., 2008). **C)** Histología de pulmones de pacientes sanos donde se ilustra la arquitectura alveolar normal. Imagen tomada de atlas de histología (Geneser, 1985)

El manejo de los pacientes con sospecha de un diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática es crucial porque el retrato en el inicio del tratamiento de la enfermedad se asocia con un mayor riesgo de muerte (Lamas et al., 2011). Es así como según varios estudios longitudinales retrospectivos sugieren que la enfermedad tiene estadísticas similares a algunos tipos de cáncer, con una mortalidad cercana al 50% entre los 3 a 5 años después del diagnóstico (Raghu et al., 2011).

1.3.3 Tratamiento

La cicatrización del pulmón producto de la fibrosis no puede revertirse y actualmente ningún tratamiento ha probado ser eficaz para detener el avance de la enfermedad. Sin embargo, algunos tratamientos pueden mejorar temporalmente los síntomas o enlentecer el avance de la enfermedad. Otros pueden ayudar a mejorar la calidad de vida o aumentar la sobrevivencia de la enfermedad. En base a la gravedad de la afección se determina el tratamiento más adecuado para cada paciente.

1.3.3.1 Medicamentos

Entre los medicamentos aprobados por la FDA disponibles actualmente se encuentra el Nintedanib, un inhibidor de la tirosina quinasa que suprime múltiples receptores de señalización implicados en la patogénesis de la fibrosis, como por ejemplo el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (Chaudhary et al., 2007).

Por otro lado, la pirfenidona es una piridina administrada por vía oral, la cual tiene efecto antiinflamatorio, antioxidante y antifibrótico. En ensayos *in vitro* demostró regular la secreción de TGF- β pero el mecanismo preciso de acción es desconocido (B.-S. Lee et al., 1998). Ambos medicamentos están aprobados en todo el mundo para el tratamiento de la FPI, ya que en ensayos clínicos han demostrado un significativo aumento de la capacidad vital forzada (FVC) durante un año en pacientes tratados en comparación con los pacientes tratados con placebo (Noble et al., 2011; Richeldi et al., 2011). La FVC es el volumen máximo de aire que puede ser espirado luego de una inhalación profunda. Una disminución de dicho parámetro es un signo de varias afecciones respiratorias.

Estos medicamentos presentan una tolerabilidad aceptable en la mayoría de los pacientes por esto son la primera opción de tratamiento, aunque aproximadamente una quinta parte de los pacientes podrían interrumpir el tratamiento debido a los efectos secundarios o a la progresión de la enfermedad. Entre los efectos secundarios la pirfenidona puede causar daños gastrointestinales como dispepsia, anorexia y efectos secundarios dermatológicos como fotosensibilidad. Mientras que la Nintedanib puede causar problemas gastrointestinales como diarrea y náuseas.

Muchas estrategias de tratamiento buscan prevenir o inhibir las respuestas fibro proliferativas. En este sentido, se probó el uso de corticosteroides como tratamiento y se sugirió su combinación con agentes citotóxicos, como la ciclofosfamida y la azatioprina, para reducir los efectos secundarios (Brown & Raghu, 2004). Entre los corticosteroides más usados para el tratamiento de la FPI se encuentra budesonida, un corticosteroide inhalado (S. G. Peters et al., 1993).

Actualmente las herramientas clínicas y terapéuticas para tratar esta enfermedad son escasas. Como se mencionó previamente una de las consecuencias de esta limitación es la baja esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con FPI. Así es como, en los casos en los que la cicatrización pulmonar compromete los pulmones de los pacientes, la terapéutica se enfoca solamente en reducir los síntomas clínicos asociados.

1.3.4 Modelos murinos de fibrosis pulmonar

Debido a la complejidad de la patología y el desconocimiento de la etiología de la fibrosis pulmonar se han utilizado múltiples modelos murinos para el estudio de la misma y el desarrollo de nuevos tratamientos. Dentro de los modelos se encuentra el de inducción de fibrosis por instilación de sílica en el pulmón de roedores que da como resultado el desarrollo de nódulos fibróticos que se asemejan a las lesiones que se desarrollan en humanos después de algunas exposiciones ocupacionales a polvo mineral y aerosoles de partículas. Por lo que este modelo tiene relevancia clínica. Una desventaja de este modelo es que la fibrosis puede tardar entre 12 y 16 semanas en desarrollarse y la respuesta fibrótica es dependiente a la cepa de animales (Davis et al., 1998; Moore & Hogaboam, 2008).

El modelo de inducción de fibrosis pulmonar mediante la administración de bleomicina (BLM) por una única dosis, es actualmente el modelo más caracterizado y utilizado para el estudio de esta patología. La BLM es una droga empleada como tratamiento para distintos carcinomas, pero se ve limitado su uso por el desarrollo de fibrosis pulmonar intersticial en un 3% al 5% de los pacientes que la reciben. Este efecto secundario es producto de la ruptura de la cadena de ADN en presencia de hierro y oxígeno, lo que da como resultado la producción en exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS). Lo

que media la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas contribuyendo a la lesión pulmonar, la inflamación y la fibrosis (Liu et al., 2017). Este modelo experimental reproduce varios aspectos claves de la enfermedad humana como la muerte de células epiteliales alveolares y la secreción de factores proinflamatorios y profibróticos. El aumento de estos factores conduce a la activación y diferenciación de los miofibroblastos, desencadenando el depósito de colágeno y componentes de la matriz extracelular (MEC) en el pulmón.

Una limitación del modelo en roedores es que la fibrosis pulmonar se resuelve, mientras que en los humanos es irreversible. Sin embargo, se puede superar esta limitación volviendo a administrar una dosis de BLM (Liu et al., 2017; Walters & Kleeberger, 2008). El desarrollo o la progresión de la lesión/fibrosis pulmonar en este modelo tiene dos etapas. La primera semana post administración de BLM es una etapa inflamatoria, la cual se caracteriza por activación de células inflamatorias y la síntesis de una multitud de mediadores inflamatorios debido al daño generalizado del epitelio, combinado con el aumento de la permeabilidad vascular y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Entre los días 7-14 post administración de BLM, se considera una fase de transición donde se observa un descenso de los mediadores pro-inflamatorios y un incremento de los mediadores pro-fibróticos. En la tercera semana post administración de BLM se registra una etapa de fibrosis crónica. Esta fase se caracteriza por la expansión de la población de miofibroblastos y el aumento del depósito de colágeno y otros elementos de la MEC en el pulmón (Liu et al., 2017; Moeller et al., 2008).

Por otro lado, las vías de administración de la BLM son diversas y la elección dependerá del objetivo del estudio. Si el objetivo es examinar un mecanismo específico o proceso en la patogenia de la fibrosis pulmonar la literatura sugiere una vía de administración directa como la administración intratraqueal (IT) de una única dosis de BLM. Esta vía de administración implica un procedimiento quirúrgico donde se expone la tráquea y se inyecta BLM directamente en la misma (Liu et al., 2017; Walters & Kleeberger, 2008). Una alternativa introducida a esta vía es la administración orofaríngea (OA), la cual resulta más sencilla porque no requiere de ningún procedimiento quirúrgico, por lo que se reduce la mortalidad perioperatoria y se acelera el procedimiento. Además, se ha reportado que esta alternativa conserva un sólido perfil fibrótico comparable al obtenido mediante la administración intratraqueal (Bale et al., 2016; Barbayianni et al., 2018).

2. N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC), es una variante acetilada del aminoácido L-cisteína. Este compuesto tiene actividad antioxidante debido a que induce el aumento de los niveles de glutatión (GSH), uno de los principales antioxidantes del cuerpo. De los tres aminoácidos que componen el GSH (glutamato, glicina y cisteína), la concentración intracelular de la cisteína limita la síntesis *de novo* del GSH. NAC se convierte en cisteína a través de una reacción de desacetilación catalizada por una acetilasa, evitando la depleción de GSH (Dekhuijzen, 2004). El GSH es críticamente importante para desintoxicar una serie de sustancias tóxicas, compuestos de peróxido y otras moléculas generadoras de radicales libres, promoviendo la desintoxicación (Dickinson et al., 2003). La NAC es un tiol dado que posee un grupo sulfhidrilo, por lo que también tiene actividad antioxidante directa hacia ciertas especies oxidantes como son los ácidos hipohalosos (HOX), los cuales son producidos por neutrófilos y monocitos activados a

través de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) (Hoy et al., 2002). En correlación con la actividad antioxidante, el tratamiento *in vivo* con NAC puede mejorar la detoxificación del tejido hepático y pulmonar mediante la promoción de GSH, mostrando una capacidad hepatoprotectora en algunas aplicaciones clínicas (Dekhuijzen, 2004).

Por otro lado, NAC tiene acción mucolítica, ya que este compuesto posee la capacidad de romper los puentes disulfuro presentes las glicoproteínas de alto peso molecular de las mucinas lo que resulta en una reducción de la viscosidad y un aumento en la depuración del mucus (Balsamo et al., 2010). Finalmente, se ha reportado una actividad inmunomoduladora reduciendo los niveles de mediadores inflamatorios y mostrando efecto en exacerbaciones producto de hipersensibilización (Aliyali et al., 2010).

2.1 Múltiples aplicaciones clínicas

La primera aplicación clínica de este compuesto es como antídoto para la sobredosis de paracetamol (p-Acetilaminofenol). Este efecto se debe a su acción en la reposición de los niveles de GSH. Además, se han demostrado efectos positivos en otras patologías como por ejemplo infecciones por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Omara et al., 1997). En ensayos clínicos en individuos seropositivos para el VIH, la administración de 800 mg de NAC aumentó los niveles de cisteína en plasma a niveles normales y ralentizó la disminución del recuento de linfocitos TCD4⁺ en comparación con el placebo (Åkerlund et al., 1996).

La investigación experimental y las observaciones clínicas iniciales indican que NAC podría tener múltiples aplicaciones terapéuticas en patologías cardíacas. Dentro de estas se postula que podría ser útil para el tratamiento de la isquemia, la cual se caracteriza por una disminución de los grupos sulfhidrilos de las células lo que da como resultado el aumento del daño oxidativo (Ceconi et al., 1988).

2.1.1 Enfermedades respiratorias

Debido a su actividad mucolítica y en conjunto con su actividad antioxidante, se estudia su aplicación en múltiples enfermedades respiratorias. Se evaluó la administración oral de NAC en enfermedades con gran producción de moco como la bronquitis crónica. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas en la función pulmonar, curvas de depuración y viscosidad pulmonar después del tratamiento con NAC en comparación con el control o placebo (Tattersall et al., 1983). En otras patologías respiratorias como la EPOC donde ocurre una inflamación crónica, la NAC demostró un efecto positivo en el curso clínico de la patología en ensayos clínicos reduciendo la viscosidad de la flema expectorada y la severidad de la tos después de dos meses de tratamiento (Committee, 1985). Entre las patologías donde la administración de NAC demostró efectos positivos, se encuentra la FPI. En ensayos clínicos aleatorizados donde se administró NAC (600 mg tres veces al día) o placebo, aquellos pacientes que recibieron NAC registraron una notable disminución del deterioro de la función pulmonar. Además, se reportó menos efectos adversos causados por la toxicidad en la médula ósea inducida por la azatioprina, medicamento estándar que ambos grupos recibieron (Sun et al., 2016).

Por otro lado, el asma es una enfermedad respiratoria donde se ha reportado incremento de ROS asociados a la exacerbación, la cual se caracteriza por una hipersecreción de mucus con alteración de la arquitectura pulmonar. Debido a estas características de la patología y el potencial de la NAC, se estudió

el efecto preventivo del fármaco en modelos murinos. Como conclusión de estos ensayos la adición de NAC a la terapia habitual mostró efectos preventivos beneficios en modelos animales (Eftekhari et al., 2013). En línea con estos resultados se realizaron ensayos clínicos aleatorizados, donde pacientes recibieron NAC en conjunto con la medicación usual para el tratamiento de asma. Sin embargo, la adición de NAC junto a los medicamentos convencionales no mostró cambios significativos en el curso de la patología (Aliyali et al., 2010).

2.2 Administración y farmacocinética

Comúnmente NAC se administra por vía oral o intravenosa. La vía más común de administración es la oral y esta presenta una absorción rápida. Sin embargo, a pesar de sus amplias propiedades mencionadas, uno de los principales problemas por el cual la administración de la NAC *in vivo* no muestra los efectos observados en ensayos *in vitro*, se debe a su metabolización por parte de las células del intestino delgado y el hígado que dan como resultado la incorporación de NAC en cadenas peptídicas de proteínas y la formación de una variedad de metabolitos secundarios. En estudios donde se marcó radiactivamente la NAC, entre el 13-38 % de una dosis oral se recupera en orina dentro de las 24 horas (Borgström et al., 1986).

La biodisponibilidad de un fármaco se refiere a la cantidad de fármaco que se encuentra en la circulación sistémica después de la administración, y que está disponible para ejercer su acción terapéutica, una baja biodisponibilidad puede limitar la eficacia del fármaco (Koch-Weser, 2010). Debido al ambiente oxidativo del intestino, los compuestos que contienen tioles son inestables; sin embargo, en el líquido intestinal solo se reportó una oxidación del 16 % de la NAC (Bonanomi & Gazzaniga, 1980). La mayor parte del fármaco se metaboliza en otros compuestos derivados. Como resultado, se estima una biodisponibilidad oral de la molécula de NAC intacta de entre 4-10 % (Borgström et al., 1986; De Caro et al., 1989; Olsson et al., 1988). Cuando se analizó la biodisponibilidad del compuesto vía intravenosa, casi el 30% de la NAC se eliminó a través de la orina, resultando en porcentajes igual de bajos que los observados para la administración oral (Navath et al., 2008). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de *delivery* para transportar y estabilizar la NAC tiene potencial cuando se investigan nuevas formas de aumentar su biodisponibilidad (Lancheros et al., 2018).

3. Sistemas de *delivery*

En enfermedades respiratorias como el asma y la fibrosis pulmonar, se sugiere que la administración de terapias directamente en las vías respiratorias es más efectiva para bloquear las crisis y brindar un alivio rápido y sostenido. Por esto, se propone la vía de administración inhalada de los tratamientos, ya que se evita el metabolismo hepático y se dirige directamente al epitelio de los bronquios y los alvéolos manteniendo una vida media aceptable de 2 a 14 h aproximadamente. (Derendorf et al., 2006).

Por otro lado, los pulmones son un sistema complejo recubierto de mucosa, la cual funciona como barrera entre las partículas suspendidas en el aire y el torrente sanguíneo, sumado a esto, en el asma se observa vasodilatación y contracción del músculo liso alterando la estructura pulmonar, dificultando aún más la asimilación de los medicamentos. En este sentido es clave la elección del sistema

de *delivery* de fármacos para asegurar el potencial terapéutico de un medicamento y la conservación del mismo. De esta forma se puede mejorar la biodisponibilidad del fármaco, reducir los efectos secundarios y aumentar la eficacia terapéutica.

Entre las múltiples estrategias de *delivery* estudiadas se encuentran las nanopartículas no metálicas biodegradables. Otra alternativa es el uso de partículas de membrana natural, o vesículas extracelulares secretadas por varias células. Estas partículas, incluidas las microvesículas y los exosomas, son capaces de encapsular las proteínas, mediadores lipídicos y ácidos nucleicos, incluidos los miARN y pueden resultar en una interesante estrategia de *delivery* (Kan et al., 2020). En este trabajo de tesis de licenciatura nos vamos a centrar en los liposomas como estrategia de *delivery*.

3.1 Liposomas

Los primeros trabajos que describen los liposomas son de 1961 del Instituto Babraham de Cambridge (John Wiley & Sons, 1980). Se describieron como sistemas de fosfolípidos de bicapa cerrada aislada de un medio acuoso y pronto se propusieron como sistemas de administración de fármacos (Pradhan et al., 2015)

Este sistema de *delivery* presenta varias ventajas. Una de ellas, es el direccionamiento selectivo al tejido blanco, como es el caso de doxorubicina liposomal, un fármaco quimioterapéutico cuya encapsulación en liposomas mejoró la biodistribución y acumulación del fármaco en el tumor (Abraham et al., 2005). Otra ventaja importante es que esta plataforma es biocompatible, completamente biodegradable, atóxica y no inmunogénica, por lo que su aplicación en la clínica resulta segura. Los liposomas están compuestos por moléculas anfipáticas por lo que son adecuados para la administración de fármacos hidrofóbicos, anfipáticos e hidrofílicos. Cuando se trata con drogas inestables o con baja biodisponibilidad como es el caso de la NAC, se requiere proteger el fármaco del entorno. Los liposomas ofrecen una solución a este problema, ya que no solo direccionan y protegen el fármaco, sino que permitirían una liberación controlada del mismo, lo que garantiza un efecto terapéutico prolongado (Antimisiaris et al., 2021). De hecho, se ha comprobado que los liposomas mejoran la absorción nasal de péptidos, como la insulina y la calcitonina, al aumentar su penetración en la membrana (Jain et al., 2007; Law et al., 2001). Se cree que esto se debe al aumento de la retención nasal de péptidos (Law et al., 2001) y a la protección de los péptidos atrapados contra la degradación enzimática (Muramatsu et al., 1999) como también a la modificación de la membrana mucosal (V. H. Lee et al., 1991).

Los liposomas se pueden clasificar en función a su estructura, método de preparación, composición, etc. Cuando se clasifica por su estructura, la nomenclatura depende del número de bicapas lipídicas y el tamaño de las partículas. Para liposomas con varias bicapas lipídicas se utiliza la abreviación MLV (por sus siglas en inglés "*multilamellar vesicles*"), para las vesículas unilaminares (UV por sus siglas en inglés "*unilamellar vesicles* ") la nomenclatura las clasifica según tamaño: las partículas chicas de entre 20-100 nm se abrevian como SUV (por sus siglas en inglés "*Small unilamellar vesicle*") y las partículas más grandes con un diámetro mayor a 100 nm se abrevian como LUV (por sus siglas en inglés "*large unilamellar vesicle*") (Samad et al., 2007)

La elección de los fosfolípidos para la formulación de los liposomas es un parámetro importante a tener en cuenta, ya que de esto depende la rigidez de las bicapas. Entre los fosfolípidos más comunes se encuentran la dimiristoilfosfatidilcolina , la dipalmitoilfosfatidilcolina , la dimiristoil fosfatidil etanolamina

y la fosfatidil serina, entre otros. El colesterol se puede agregar a la mezcla de bicapas cuando se necesite regular la fluidez de membrana de los liposomas (Pradhan et al., 2015).

3.1.1 Aplicaciones clínicas de los liposomas

Los liposomas son los primeros sistemas de administración de nanofármacos que se han adoptado exitosamente en la clínica desde 1990. Cuando se aprobó por primera vez la formulación de doxorubicina encapsulada en liposomas (Doxil®) para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos. Su aprobación por la FDA se basó en ensayos preclínicos y clínicos donde se demostró un mayor depósito de los liposomas en los tumores incrementando la potencia antitumoral del fármaco (Abraham et al., 2005; Samad et al., 2007). Posteriormente, se desarrolló una formulación liposomal de daunorrubicina, un agente quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas nombrado como DaunoXome® que fue aprobado por la FDA en 1996 para el tratamiento del sarcoma de Kaposi asociado al VIH avanzado. Además, se está llevando a cabo una amplia investigación para aplicar estos sistemas de administración de nanofármacos en diversas áreas, incluida la administración de medicamentos anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatorios y genes terapéuticos (Bulbake et al., 2017).

3.1.1.1 Aplicaciones clínicas en enfermedades respiratorias

Los sistemas de *delivery* basados en liposomas para la administración pulmonar de fármacos han demostrado ser una estrategia útil para conseguir el almacenamiento de fármacos y proporcionar liberación controlada en los pulmones. En un principio, la administración de fármacos en aerosol en los pulmones se investigó particularmente para el desarrollo de terapias para el asma atópica.

En 1997, se realizó un estudio clínico en un grupo de pacientes con asma bronquial grave dependiente de esteroides, se les administró vía intratraqueal durante la realización de una broncoscopia una formulación liposomal de hidrocortisona. Se observó una restauración de los indicadores normales de inmunidad humoral y celular, así como la reducción de la inflamación en la tráquea y los bronquios cuando se administró la formulación liposomal. Este efecto se potenció cuando se realizó una terapia combinada, donde se administró la formulación liposomal por vía intratraqueal junto con la forma estándar por vía sistémica (Prishchepa & Landyshev, 1997). En otro intento de mejorar los tratamientos para el asma, Konduri *et al* investigaron el efecto de la budesonida, un esteroide inhalado, encapsulado en liposomas en un modelo murino. Los resultados sugieren que esta formulación del fármaco mejora significativamente la inflamación pulmonar y reduce la toxicidad de los esteroides inhalados (Konduri et al., 2005). Posteriormente, Chen *et al* diseñaron liposomas para encapsular sulfato de salbutamol (SBS), un agonista β_2 adrenérgico de efecto rápido. Esta formulación permite administrarlo vía aerosol y demostró un efecto antiasmático más prolongado que el SBS libre (Chen et al., 2012).

Los liposomas pueden diseñarse para administrar antimicrobianos para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias. Un ejemplo es el ensayo clínico de fase II aleatorizado realizado por Olivier *et al* dónde se administró amikacina liposomal inhalada para tratamiento de la enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas. Los resultados indican que el tratamiento promovió la conversión negativa del esputo e indujo una menor toxicidad en comparación con la amikacina parenteral. Además, a través de un ensayo clínico controlado aleatorizado realizado por Okusanya et al

se observó que la formulación de amikacina liposomal mejora la función pulmonar y reduce la densidad bacteriana en el pulmón de pacientes con infección crónica por *Pseudomonas* (Okusanya et al., 2009; Olivier et al., 2017).

Otra enfermedad respiratoria crónica para la cual se diseñaron sistemas de *delivery* a base de liposomas es la fibrosis pulmonar. Un ejemplo es la formulación liposomal desarrollada por Chennakesavulu *et al.*, los cuales obtuvieron liposomas de budesonida y colchicina capaces de administrarse por inhaladores. Los resultados mostraron una retención prolongada del fármaco en el sitio de acción y la reducción de la exposición sistémica de esta formulación (Chennakesavulu et al., 2018).

En conjunto, estas observaciones son relevantes para la presente tesis, ya que proporcionan antecedentes sobre la elección de esta estrategia de *delivery* para el tratamiento del asma y fibrosis.

3.1.1.2 Surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar es un agente tensioactivo natural producido por los neumocitos presentes en el epitelio alveolar. Su función es reducir la tensión superficial de la interfase aire-agua alveolar lo que facilita la expansión de los sacos alveolares durante la inhalación evitando el colapso de los alvéolos y mejorando la eficiencia de la respiración. Además, también se encuentra presente en las vías respiratorias estrechas bronquiales y traqueales. Se ha sugerido que la función del surfactante en las vías respiratorias superiores es la de mantenerlas abiertas y sin obstrucciones, lo que permite el flujo de aire a través de capilares estrechos. El surfactante también tiene propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, lo que ayuda a proteger los pulmones de infecciones (Nag et al., 2007).

La composición de este agente tensioactivo natural está dada principalmente por proteínas y lípidos. En cuanto a su contenido lipídico, está representado por fosfolípidos tales como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), la palmitoil-miristoil-fosfatidilcolina (PMPC) y la palmitoil-palmitoleoil-fosfatidilcolina (POPC) (Bernhard, 2016). Al tratarse de fosfolípidos naturalmente presentes en el surfactante pulmonar, resulta interesante diseñar liposomas a base de estos fosfolípidos como sistema de *delivery* de drogas que tengan como blanco el aparato respiratorio.

3.1.2.3 Formulaciones liposomas con N-acetilcisteína

Los investigadores Hamedinasab *et al.* formularon liposomas recubiertos de quitosano (CH) cargados con NAC. Los resultados mostraron que el recubrimiento del liposoma con CH dio como resultado la liberación prolongada de NAC y una captación efectiva por parte de las células epiteliales, por lo que resulta un vehículo prometedor para el suministro de NAC a los pulmones mediante terapia de inhalación (Hamedinasab et al., 2020).

También se desarrollaron polvos secos liposomales de N-acetilcisteína para administración pulmonar. El fármaco encapsulado tuvo mejor actividad antioxidante *in vitro* que las formulaciones líquidas y sólidas que contenían el fármaco no encapsulado, lo que lo convierte en un buen candidato para el tratamiento de enfermedades pulmonares asociadas al estrés oxidativo (Ourique et al., 2014).

Otro ejemplo de encapsulación de la NAC con el fin de evaluar su potencial antioxidante, fue su uso aplicado en el tratamiento de intoxicación por paraquat, un herbicida con alta citotoxicidad para el cual no existe tratamiento específico. La encapsulación de NAC potenció la actividad antioxidante, ya

que el pretratamiento de las células con la formulación liposomal fue significativamente más efectivo que el pretratamiento con el fármaco convencional en la reducción de la citotoxicidad (Mitsopoulos & Suntres, 2011).

Hipótesis

La incidencia de las enfermedades respiratorias crónicas ha ido en aumento a nivel mundial. En Argentina, estas enfermedades representan más del 25% del total de muertes en la Ciudad de Buenos Aires. Existe una necesidad de generar nuevos tratamientos contra estas afecciones.

La N-acetilcisteína es una droga ampliamente usada en diversas afecciones por sus propiedades mucolíticas, antioxidantes y antiinflamatorias, sin embargo, su baja biodisponibilidad restringe su aplicación y efectividad. Esta limitación podría superarse utilizando nuevas formas de *delivery* al pulmón para aumentar su biodisponibilidad, entre ellas los liposomas resultan una estrategia muy prometedora.

Para el diseño de liposomas que dirijan drogas al pulmón, una estrategia interesante es el uso de los fosfolípidos naturalmente presentes en el surfactante pulmonar de mamíferos.

Todo lo presentado nos permite enunciar la hipótesis de que **los liposomas obtenidos con fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar son un buen sistema de *delivery* de N-acetilcisteína lo que mejora su efectividad contra enfermedades respiratorias como el asma y la fibrosis pulmonar.**

Objetivo general

Este trabajo de tesis de licenciatura se enmarca en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades respiratorias. En particular, nos focalizamos en el estudio pre-clínico de la formulación N-acetilcisteína/liposoma para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Objetivos específicos

1. Evaluar el potencial terapéutico de N-acetilcisteína encapsulado en liposomas en un modelo de asma murino.
2. A) Establecer un modelo murino de fibrosis pulmonar mediante la administración de bleomicina vía orofaríngea.
B) Evaluar el potencial terapéutico de los N-acetilcisteína encapsulado en liposomas en un modelo de fibrosis

Metodología

1. Síntesis de liposomas

Para obtener liposomas en forma de vesículas multilamelares (MLVs) se utilizó el método de deshidratación-rehidratación como describió previamente (Bujan et al., 2020).

Brevemente, se disolvieron los lípidos correspondientes a la formulación en un volumen pequeño de metanol (entre 0.2 y 0.5 mL). Luego, se evaporó el solvente para obtener un *film*, el cual se resuspendió en 1 ml de PBS (pH 7,4) o una solución de NAC en una concentración necesaria para cada modelo.

Se utilizaron una mezcla de fosfolípidos naturalmente presentes en el surfactante pulmonar en las siguientes proporciones: DPPC 60%; PMPC 20% y POPC 20% (Bernhard, 2016). Para la obtención de los liposomas cargados de NAC se utilizó una proporción lípidos: NAC de 10:1.

Con el objetivo de obtener vesículas unilaminares, se realizó la extrusión múltiple por membranas de 100 nm como describe (Mayer et al., 1986).

2. Diseño experimental y análisis estadístico

Se emplearon como mínimo 5 ratones por grupo experimental, este dato puede variar en los ensayos que se realizaron para poner a punto cada modelo de ser el caso se mencionara en la sección de resultados cuando se reporte los resultados de esos ensayos. Se establecieron 5 grupos de trabajo, los cuales se mencionan a continuación:

- Ratones *naive* (control)
- Ratones con patología respiratoria (control patología)
- Ratones con patología respiratoria +NAC
- Ratones con patología respiratoria + NAC/liposoma
- Ratones con patología respiratoria + vehículo (liposoma) (control vehículo)

Se analizó si los datos presentan una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk, los datos cumplían con dicha condición y se les realizó un análisis de las diferencias de varianza entre grupos (ANOVA) y un test de Tukey *a posteriori*. Para el análisis semicuantitativo de los índices patológicos o en caso de que los resultados no cumplieran con las características requeridas para utilizar un test paramétrico, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis con Dunns *a posteriori*. En todos los casos se tomó como diferencia significativa $p < 0,05$.

3. Modelo experimental asma

3.1 Animales

Se utilizaron hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares, recibiendo agua y comida *ad-libitum* con un ciclo 12:12 horas de luz:oscuridad, y humedad y temperatura ambiente controlada (22-24 °C), en el bioterio del Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente del Instituto de Tecnologías Emergentes y Ciencias Aplicadas (ITECA),

ECyT_UNSAM_CONICET. Para el uso y cuidado de animales de laboratorio se siguieron las directivas del NIH (por sus siglas en inglés –*National Institute of Health*-) (NIH Publication - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition), los lineamientos del CICUAE la UNSAM y la normativa de referencia para Bioterios: Disposición N.º 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). El presente proyecto cuenta con la aprobación del CICUAE UNSAM 19/2022.

3.2 Modelo de asma y esquema de administración de tratamientos

Se empleó un clásico modelo de asma contra ovoalbúmina (OVA) y sensibilización parenteral. Se seleccionó este modelo debido a su amplia caracterización en la literatura y dado que se emplea de rutina en nuestro laboratorio (A. Soto et al., 2022; A. S. Soto et al., 2017; Zappia et al., 2019). Dicho modelo se basa en sensibilizar con dos inoculaciones de OVA (20 µg) como alérgeno junto con el adyuvante hidróxido de aluminio (2 mg) en PBS por vía intraperitoneal (IP). Una semana después de la última inoculación, los animales se desafiaron por vía aérea con una solución de OVA al 3% en PBS durante 3 días consecutivos por aproximadamente 30 minutos cada día. La exposición vía aérea se realizó en compartimientos individuales de una cámara conectada a un nebulizador (San-Up, San Martín, Argentina, flujo de la solución de OVA 0,33 ml/min en un flujo de aire de 6–8 l/min).

Una vez establecido el fenotipo asmático se administró el tratamiento indicado para cada grupo experimental descrito en la tabla 1. Para este modelo, la concentración de NAC utilizada para este modelo es 0,1 mg/ml y se administró en un volumen de 50 µl por ratón vía intranasal. Previo a la administración de los tratamientos se anestesiaron los ratones con xilacina (68 mg/kg) y ketamina (11 mg/kg). En total se administraron 4 dosis de los tratamientos en los días 17, 18, 22 y 23, luego de comenzado el modelo de asma (figura 6). Para simular una re-exposición a los alérgenos se volvió a desafiar con una solución de OVA (3%) al tercer día de tratamiento, es decir, el día 22 en el protocolo. Se esperó un lapso de 48 horas posterior al último desafío aéreo con OVA para realizar la eutanasia de los ratones y el posterior análisis. Este protocolo experimental se esquematiza en la figura 6.

El protocolo de tratamiento descrito es el que se logró estandarizar durante esta tesis, en caso de haber modificaciones durante la puesta a punto de los modelos se detalla en cada figura y sección correspondiente. Durante el desarrollo de este protocolo se establecieron 5 grupos de trabajo que se detallan en la tabla 1.

Grupo Experimental	IP	Desafío	Tratamiento
Naive (N)	PBS	PBS	PBS
Asmático (A)	OVA/Alum	OVA	PBS
Vehículo (A+ Lip)	OVA/Alum	OVA	Liposomas
Tratamiento convencional (A+NAC)	OVA/Alum	OVA	NAC
Formulación liposomal (A+Nac-Lip)	OVA/Alum	OVA	NAC-Liposomas

Tabla 1: Grupos experimentales utilizados en el modelo murino experimental de inducción de asma

3.3 Análisis del fenotipo asmático

3.3.1 Lavado broncoalveolar y conteo celular diferencial

Se llevó a cabo la eutanasia de los animales utilizando una cámara saturada con isoflurano. Posteriormente, se realizó la toracotomía y se sangraron los ratones por punción cardiaca, las muestras de sangre se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos para obtener el suero. Este se conservó a -20 °C para la posterior medición de anticuerpos. Se continuó con la canulación de la tráquea de los ratones. Se realizó un primer lavado broncoalveolar (BAL) con 0,5 ml de PBS estéril, posteriormente se realizaron 4 BAL con 1 ml de PBS. Lo obtenido en el primer lavado se centrifugó a 300 g durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se congeló a -80 °C. A partir de estos sobrenadantes se realizó la posterior medición de citoquinas. El *pellet* que contiene las células fue resuspendido en PBS y sumado a los otros BAL realizados previamente. Este conjunto de células se centrifugó y el *pellet* obtenido se resuspendió en 0,5 ml de PBS. Utilizando una cámara de Neubauer se contabilizó el número total de células empleando el colorante Türk para facilitar la visualización al microscopio de leucocitos.

3.3.2 Cultivo celular

Se realizó la esplenectomía de los ratones en condiciones de esterilidad. Los bazos fueron disgregados, lisados y lavados para la obtención de esplenocitos. Los experimentos de cultivo celular se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo plano.

Para evaluar la respuesta específica de los linfocitos activados por el alérgeno OVA del modelo de asma se estimularon los esplenocitos con 40 µg de OVA en un volumen final de 200 µl por pocillo durante 72 hs. Para evaluar la respuesta T se utilizó una estimulación inespecífica con un mitógeno T, concanavalina A (ConA), a una concentración de 5 µg/ml durante 48 hs. Para el cultivo, se sembraron 4×10^5 células por pocillo en presencia de los estímulos en un medio compuesto por RPMI-1640 suplementado con un 20% de SFB, un 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco) y 50 µM β-Mercaptoetanol (Gibco). Pasado el tiempo de estimulación se recolectaron los sobrenadantes para el posterior análisis de niveles de citoquinas por ELISA.

3.3.3 Histopatología

Se procedió con la extracción del pulmón, los mismos se instilaron y fijaron con formalina. Los pulmones se incuyeron en parafina y se generaron secciones de 5 µm de espesor, las cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E), con el objetivo de identificar el infiltrado celular o con una tinción Hematoxilina-PAS (periodic acid-Schiff) para discriminar las células productoras de mucus.

Para poder realizar un análisis estadístico se llevaron adelante índices patológicos de infiltrado inflamatorio y mucus. Para establecer un índice de infiltrado se clasificó el infiltrado en torno a 10 vías respiratorias y 10 vasos de acuerdo al grado de severidad (0: normal; 1: mayor o igual que 1 y menor que 4 células de espesor; 2: mayor igual que 4 y menor que 10; 3: mayor o igual a 10 y menor que 15; 4: mayor o igual a 15) y la representación de cada grado de severidad (extensión) en el preparado (0: menor que 5% ; 1: mayor o igual a 5 y menor que 25%; 2, mayor o igual a 25 y menor que 50%; 3: mayor o igual a 50 y menor a 75%; 4: mayor que 75%). El índice se calculó como la sumatoria de la multiplicación entre el grado de severidad y su extensión en el preparado. El índice de mucus se calculó

en secciones transversales de pulmón teñidas con PAS, observando 10 vías aéreas de tamaño similar a un aumento de 400X y categorizando la abundancia de células productoras de mucus (0: menor a 5% de células, 1: entre 5 y 25%; 2: entre 25 y 50%; 3: entre 50 y 75%; 4: mayor a 75%). El índice para cada muestra se calculó como el promedio del índice de abundancia de mucus entre las 10 vías.

3.3.4 Medición de anticuerpos en suero

3.3.4.1 Medición de IgE

Se realizó la medición de los anticuerpos en suero específicos para OVA mediante un ELISA indirecto, para esto se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc maxisorp) se cubrieron los pocillos con 50 μ l de OVA (10 μ g/ml), utilizándolo como antígeno, en buffer carbonato (pH=9,5) y se colocaron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente se lavaron 3-4 veces con 250 μ l de buffer de lavado (PBS-0,05% Tween). Posteriormente, se bloquearon con 100 μ l de buffer de bloqueo (PBS-1% leche descremada en polvo) durante dos horas a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μ l de las muestras del suero a evaluar previamente diluidas y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante una hora. Se repitió el paso de lavado y se agregó un anticuerpo anti-IgE de ratón biotinilado (BD PharMingen, San Diego, CA) el cual se dejó incubando por una hora a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente y se adicionó la enzima peroxidasa acoplada a estreptavidina (HRP, streptavidin-horseradish peroxidase, Zymed, 1/4000). Luego de incubar media hora a temperatura ambiente, se reveló con 50 μ l tetrametilbencidina (TMB One-Step, Life Technologies) y se midió a 620 nm con un lector de placas (Sunrise RC, Tecan). Luego se frenó la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 1M, y se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran como densidad óptica (OD) a una dilución 1/10 del suero.

3.3.4.2 Medición de IgG1 e IgG2a

Para la medición de los dos subtipos de IgG se siguió el mismo protocolo que para IgE pero, con la única variación luego de haber incubado las muestras, se agregaron 50 μ l de anticuerpos anti-IgG1 o anti-IgG2a, acoplados a HRP (1:3000, BD PharMingen, San Diego, CA) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se revelaron con TMB (50 μ l, One-Step, Life Technologies). La reacción colorimétrica fue medida a 620 nm con un lector de placas. Finalmente, se leyó a 450 nm (Sunrise RC, Tecan) luego de frenar la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 1M. Los resultados se muestran como densidad óptica (OD) a una dilución 1/1000 para IgG2a y 1×10^{-6} para IgG1 del suero.

3.3.5 Medición de citoquinas

A Partir del primer lavado broncoalveolar y el sobrenadante del cultivo de esplenócitos se realizó la medición de los niveles IL-4 e IL-5 (tipo Th2), IFN- γ (tipo Th1), IL-10 (regulatoria) mediante un ELISA tipo "sándwich" con los kits comerciales de BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

4. Modelo Fibrosis

4.1 Animales

Para este modelo experimental, se decidió usar el modelo de inducción de fibrosis por administración de bleomicina. La respuesta fibrótica en ratones es dependiente de la cepa, siendo los ratones C57Bl/6 los más susceptibles (Walters & Kleeberger, 2008). Por esto se utilizaron ratones de esta cepa provenientes del Bioterio de la Facultad de Exactas y Ciencias Naturales (UBA). Si bien no hay todavía un acuerdo sobre si el sexo de los ratones influye, algunas publicaciones reportan una mayor susceptibilidad en los ratones machos de esta cepa (Liu et al., 2017; Walters & Kleeberger, 2008). Por lo ya mencionado, se trabajó con ratones machos C57Bl/6, los cuales se mantuvieron en el Bioterio del CESyMA bajo las condiciones ya mencionadas. El presente protocolo cuenta con la aprobación del CICUAE UNSAM 19/2022

4.2 Modelo de inducción de fibrosis pulmonar

Para el protocolo experimental de fibrosis pulmonar se realizó el modelo de inducción por administración de una única dosis de BLM vía aspiración orofaríngea (OA) a una concentración de 0,8 U/kg (Barbayanni et al., 2018). Para realizar este protocolo, previamente se anestesiaron a los ratones mediante la administración intraperitoneal de Ketamina/Xilacina a una dosis de 87 mg/kg y 13 mg/kg respectivamente, en un volumen final de 50 μ l por ratón. La administración de la BLM se realizó siguiendo en detalle el protocolo descrito (Walters & Kleeberger, 2008). Brevemente, se suspendió al animal anestesiado boca arriba en una tabla inclinada de aproximadamente 60 grados con una banda elástica debajo de los incisivos superiores. Esta posición aseguró que la epiglotis permita solamente el paso hacia las vías respiratorias a través de la laringe. Con la ayuda de una pinza se sacó y sostuvo la lengua y con una micropipeta se descargó gota a gota 50 μ l de la solución de BLM en la cavidad bucal, tapando los orificios nasales para forzar la inhalación de la BLM. Una vez administrada la droga, se colocaron los ratones sobre una almohadilla térmica con el objetivo de evitar episodios de hipotermia mientras se recuperaban de la anestesia.

Para evaluar el potencial de la formulación NAC/liposomas se administraron los tratamientos previo a la inducción de fibrosis pulmonar para de esta forma evaluar el potencial antioxidante y antiinflamatorio de los tratamientos (Moeller et al., 2008). Se administraron 4 dosis de tratamientos para los grupos experimentales y PBS a los controles vía intranasal, los animales se encontraban anestesiados como se indicó en el párrafo anterior. Tres dosis del tratamiento se administraron 6,4 y 1 día previo al inicio del modelo de inducción de fibrosis pulmonar. La última dosis se administró el día post administración de bleomicina. Luego se esperó hasta el día 14, donde se realizó el análisis del fenotipo fibrótico a los tratamientos y controles mencionados en diseño experimental. De esta forma se estableció el diseño experimental utilizado en este trabajo y el cual se esquematiza en la figura 4.



Figura 4: Modelo murino de fibrosis pulmonar mediante administración de BLM vía OA tomando este como día 0. Previamente, se realizó la administración de los tratamientos asignados según grupo experimental en los días -6,-4 y -1. La última dosis de tratamientos se da el primer día post administración de BLM.

Durante el desarrollo de este protocolo experimental se establecieron 5 grupos de trabajo, a los cuales se les realizó administrar distintos tratamientos detallados en la tabla 2:

Grupo Experimental	OA	Tratamiento
Naive (N)	PBS	PBS
Fibrótico (F)	BLM	PBS
Vehículo (F+ Lip)	BLM	Liposomas
Tratamiento convencional (F+NAC)	BLM	NAC
Formulación liposomal (F+Nac-Lip)	BLM	NAC-Liposomas

Tabla 2: Grupos experimentales utilizados en el modelo murino experimental de inducción de fibrosis pulmonar

4.3 Evaluación del fenotipo fibrótico

4.3.1 Estado general de los animales: Peso y comportamiento por ensayo de *Open field*

Por otro lado, durante el experimento, se registró el peso previo y post administración de BLM, como medida de control de la salud de los ratones, ya que está ampliamente reportada la pérdida de peso como un indicador tradicional de este modelo (Bale et al., 2016; Barbayianni et al., 2018). En caso de tener decesos durante el experimento se registraron con estos datos, se realizó una curva de supervivencia (Kaplan-Meier plot). Para registrar cambios en la conducta y motilidad de los ratones expuestos al modelo de fibrosis pulmonar se realizó un ensayo de comportamiento de campo abierto (*Open field*), 4 días post administración de BLM. Este examen se fundamenta en la aversión de las especies gregarias por los espacios abiertos (Kraeuter et al., 2019). Brevemente, se documentó el comportamiento de cada ratón durante 5 minutos de confinamiento en una arena rectangular de 40 cm x 40 cm, con paredes altas que imposibilitan el escape, y una grilla con 16 cuadrados de 10 cm x 10 cm dibujados en la base. El animal se colocó inicialmente en el cuadrante central de 20 cm x 20 cm, y se registraron 3 parámetros: la "distancia recorrida" por los animales, el "Rearing", que corresponde al número de veces en las que el ratón queda en bipedestación y el "Climbing", es decir la cantidad de veces que el ratón contacta la pared de la arena con sus patas delanteras (Zimprich et al., 2014).

4.3.2 Lavado broncoalveolar y conteo celular diferencial

Se realizó la recolección del BAL y posterior conservación de las muestras siguiendo el protocolo que se detalla para el análisis del fenotipo asmático. Se prosiguió contabilizando el número total de células presentes en los BLM mediante cámara de Neubauer para esto se tiñó con el colorante Türk. En particular, para este modelo experimental se realizó distinción y conteo de las células polimorfonucleares (PMN).

4.3.3 Cultivo celular

Para el cultivo celular se siguió el protocolo detallado previamente con algunas diferencias en el tiempo de cultivo y estímulos. Además, se realizó una estimulación inespecífica para inducir la producción de citoquinas, se utilizaron como estímulos PMA (por sus siglas en inglés "*Phorbol-12-myristate 13-acetate*") y Ionomicina (ionóforo de calcio). Por último, se cultivó una placa sin estimular como blanco. Se probaron 3 tiempos de estimulación 24, 48 y 72 horas y pasado cada tiempo se recolectaron los sobrenadantes para el posterior análisis de niveles de citoquinas por ELISA.

4.3.4 Extracción de proteínas pulmonares

Se destinó una porción del lóbulo derecho del pulmón de los ratones para extracción de proteínas. Se conservó la porción del lóbulo en 500 µl de Trizol (Thermo Fisher) en tubos *ependorf* de unos 1,5 ml libres de ARNasa y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente se siguió el protocolo del fabricante indicado para realizar la extracción de proteínas. Brevemente, las muestras se homogeneizaron individualmente empleando un *potter* de vidrio y se realizó una centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se agregaron 0,1 ml de cloroformo a cada tubo y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Se colectó la fase orgánica para continuar con la extracción de proteínas. Se agregó 0,75 ml de isopropanol e incubó durante 10 minutos, luego se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet resuspendido en 1 ml de solución de lavado (clorhidrato de guanidina 0,3 M en etanol al 95%) e incubó durante 10 minutos. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 7500 g a 4 °C y descartó el sobrenadante. Se repitió el lavado del pellet. Posteriormente, se agregó 1 mL de etanol al 100% e incubó durante 20 minutos, se repitió una centrifugación 7500 g durante 5 minutos y descartó el sobrenadante. Por último se dejó secar el *pellet* durante 5-10 minutos y finalmente se resuspendió el *pellet* en 200 µL de SDS al 1%.

Para determinar la concentración de proteína extraída se realizó mediante el reactivo de Bradford. A partir de este extracto se cuantificó también TGF- β mediante un ELISA tipo *sandwich*.

4.3.5 Histopatología

Se procedió con la extracción del otro lóbulo del pulmón, los mismos se instilaron y fijaron con formalina y se incluyeron en parafina. A partir de estos se obtuvieron cortes histológicos, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E), con el objetivo de observar la arquitectura pulmonar e identificar el infiltrado pulmonar. Para realizar un análisis estadístico, se examinó la totalidad del corte histológico, escaneado sistemáticamente en un microscopio usando un objetivo 10x. Cada campo

sucesivo fue evaluado individualmente para la gravedad de la fibrosis intersticial y se le asignó una puntuación entre 0 y 8 utilizando sistema de clasificación semicuantitativo de Ashcroft modificado (Hübner et al., 2008). Para asignar las puntuaciones se tuvieron en cuenta, los criterios enunciados en el trabajo de investigación de Hubner *et la* , los cuales se resumen en la tabla 3.

Grado de fibrosis	Criterios para clasificar la fibrosis pulmonar
0	Septo alveolar: sin carga fibrótica presente en los alvéolos
	Estructura pulmonar: pulmón normal
1	Septo alveolar: Cambios fibróticos leves aislados
	Estructura pulmonar: Alvéolos parcialmente agrandados y ramificados pero sin presencia de masas fibróticas
2	Septo alveolar: cambios fibróticos claros (tabique más grueso de lo normal)
	Estructura pulmonar: Alvéolos parcialmente agrandados y ramificados pero sin presencia de masas fibróticas
3	Septo alveolar: paredes fibróticas contiguas (tabique 3 veces más grueso) predominantemente
	Estructura pulmonar: Alvéolos parcialmente agrandados y ramificados pero sin presencia de masas fibróticas
4	Septo alveolar: Variable
	Estructura pulmonar: Masas fibróticas aisladas ($\leq 10\%$ de del campo del microscopio)
5	Septo alveolar: Variable
	Estructura pulmonar: Masas fibróticas confluentes (10%-50% del campo del microscopio). y estructura pulmonar severamente dañada pero aún conservada.
6	Septo alveolar: Variable, casi no existe
	Estructura pulmonar: Grandes masas fibróticas contiguas ($>50\%$ de campo del microscopio). La arquitectura pulmonar en su mayoría no se conserva
7	Septo alveolar: No existe
	Estructura pulmonar: Alvéolos casi totalmente obstruidos con tejido fibroso pero aun hasta cinco burbujas de aire
8	Septo alveolar: No existe
	Estructura pulmonar: Campo del microscopio con obstrucción completa por masas fibróticas

Tabla 3: Caracterización de la Escala Modificada de Ashcroft

Por otro lado, se realizó una tinción rojo sirio, la cual nos permitió identificar las fibras de colágeno de color rosa brillante, mientras que el tejido epitelial y los vasos sanguíneos fueron de color amarillo. Se adquirieron 3 fotos por corte histológico de cada grupo experimental a un aumento de 400x en un microscopio óptico. A Partir de estos archivos se cuantificó la cantidad de fibrosis mediante evaluación de la proporción de área con fibrosis positiva para rojo sirio empleando la opción de deconvolución de imágenes de histologías del software ImageJ/FIJI. El valor de porcentaje de área coloreada se asigna realizando el promedio de las 3 mediciones.

4.3.6 Medición de marcadores de fibrosis pulmonar

4.3.6.1 Medición de proteínas totales en BAL

Se realizó la estimación de la concentración total de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Se realizó una curva estándar con una solución de BSA 0,2 mg/ml. Las muestras se diluyeron en 100 μ L según corresponda para que sea posible la interpolación de los resultados obtenidos en la curva estándar. Luego se agregó 900 μ L de Reactivo de Bradford. Se realizó la detección por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm.

4.3.6.2 Medición de mieloperoxidasa en BAL

Se realizó la medición de mieloperoxidasa en los BAL en placas de 96 pocillos se sembraron 30 μ L del primer BAL y se adicionó el mismo volumen de TMB, la reacción colorimétrica se midió en un lector de placas a 620 nm.

4.3.7.3 Medición de Lactato deshidrogenasa en suero

A partir de las muestras de sangre, se obtuvo el suero mediante una centrifugación, se cuantificó la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit unitest de Wiener lab, mediante una reacción de UV a una longitud de onda de 340 nm.

4.3.8 Medición de citoquinas

A partir del primer lavado broncoalveolar y del sobrenadante del cultivo de esplenocitos se realizó la medición los niveles IL-4 (tipo Th2), TNF- α , IL-6 (tipo Th1), IL-10 (Treg) mediante un ELISA tipo "sandwich" con kits comerciales de BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Además, se evaluaron los niveles de TGF- β como marcador pro-fibrótico. El protocolo usado es similar, pero con la diferencia de que las muestras fueron activadas previamente. Para esto, 100 μ L de cada muestra se trataron con 20 μ L de HCL 1N e incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se le agregaron 20 μ L de NaOH 1N y se mezcló (para el cálculo de la concentración se corrige luego por un factor de dilución de 1,4). Como diluyente se utilizó el provisto por el kit comercial (e-Bioscience, Inc., San Diego, CA, USA). La absorbancia se midió a 450 nm luego de agregar 50 μ L de H₂SO₄ 1M.

Resultados

1. Asma atópica

1.1 Modelo de asma murino

Se empleó un modelo óptimo de asma experimental, el cual ha sido utilizado previamente en el laboratorio para evaluar protocolos terapéuticos. Este modelo murino experimental reproduce varios cambios patológicos observados en el asma bronquial, como los altos niveles de anticuerpos IgE específicos para el alérgeno, inflamación alérgica pulmonar con predominio de eosinófilos y aumento de células productoras de mucus y desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas dependiente de la producción de citoquinas de tipo Th2 (A. Soto et al., 2022; A. S. Soto et al., 2017; Zappia et al., 2019).

El modelo de asma consiste en dos inoculaciones con OVA/Aluminio vía intraperitoneal (IP). Luego, se realizaron desafíos por vía aérea con OVA al 3% durante 3 días consecutivos. Una vez establecido el fenotipo asmático, se decidió desarrollar un esquema de administración terapéutico de los tratamientos para evaluar el potencial mucolítico y antioxidante de la NAC. Se determinó administrar 4 dosis de tratamiento en distintos días (Figura 6).

1.1.1 Selección de la concentración de la NAC

Para determinar la concentración de la NAC necesaria para observar efectos en el fenotipo asmáticos, se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionaron dos concentraciones (0,1 mg/ml y 0,2 mg/ml) de NAC. A partir de la selección de las concentraciones candidatas, se realizó un ensayo piloto con pocos animales (n=12) para evaluar el efecto de estas concentraciones. En este ensayo se realizaron dos controles, un control *naive* (N) y un control asmático (A).

En este ensayo piloto solo se evaluó el número total de células en los BAL (Figura 5). La concentración 0,1 mg/ml mostró una disminución, aunque no significativa, del número total de células. Por este motivo se seleccionó esta concentración para seguir trabajando.

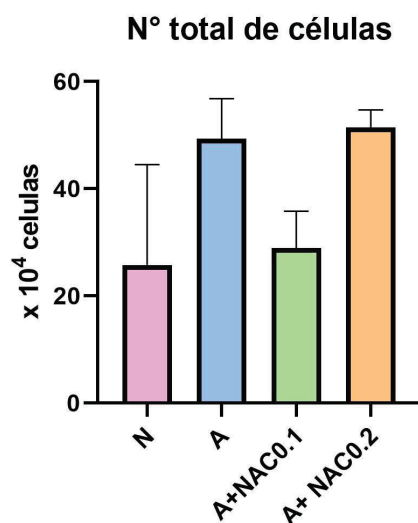


Figura 5: Conteo número total de células del BAL de los distintos grupos control (N: *naive*; A: asmático) y los grupos tratados con las dos concentraciones de NAC (A+NAC 0,1 mg/ml Asmáticos tratados con 0,1 mg/ml; A+NAC 0,2 mg/ml: Asmático tratados con 0,2 mg/ml)

Asimismo, pudimos observar que en el grupo de animales expuestos al modelo de asma se observan menores niveles de infiltrado celular pulmonar al que normalmente obtenemos en el laboratorio. Esta diferencia podría deberse a que de rutina este parámetro se evalúa 48 horas luego de la última exposición con el alérgeno. En este ensayo la última exposición pudo haber quedado muy lejana al punto final del experimento (eutanasia). Por esto, en los próximos ensayos se decidió sumar un nuevo desafío con el alérgeno 48 hs previas al análisis.

1.2 Protocolo experimental

De esta manera se estableció el protocolo de trabajo para el modelo de asma como se muestra en la figura 6.

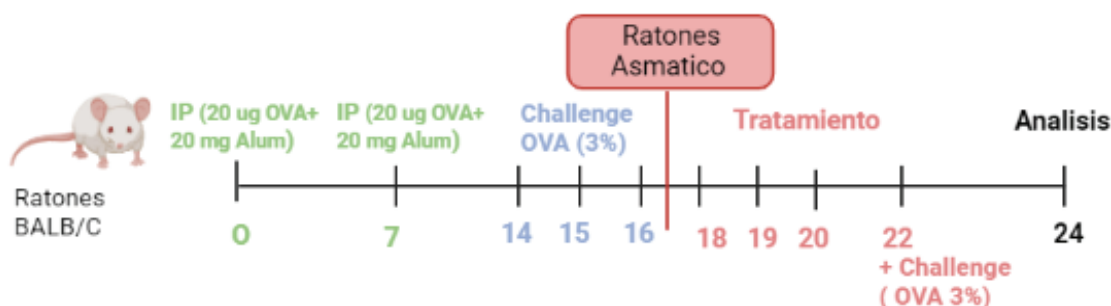


Figura 6: Modelo murino de *asma* mediante sensibilización con OVA (20 µg) + hidróxido de aluminio (2 mg) en PBS por vía intraperitoneal en los días 0 y 7. Posteriormente, se desafió vía aérea con una solución de OVA al 3% en PBS durante tres días consecutivos (14, 15 y 16 días). Se prosiguió con un esquema de 4 dosis de tratamientos asignados según grupo experimental en los días 17, 18, 20 y 22.

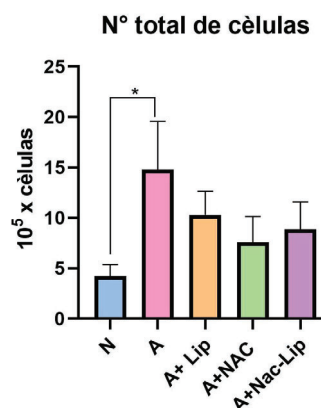
1.3 Análisis del fenotipo asmático

1.3.1 Células en BAL

Partiendo de este protocolo, se realizó un segundo ensayo con un número mayor de réplicas (5 animales por grupo). Con los grupos experimentales y controles mencionados en la tabla 2 en la sección de Materiales y Métodos.

Para evaluar el efecto de los tratamientos, en primer lugar se contabilizó el número total de células en BAL. Durante el establecimiento del asma se genera una inflamación alérgica caracterizada por un aumento del infiltrado inflamatorio de las vías aéreas (Holgate & Douglass, 2013). Como se muestra en la figura 7, solamente el control asmático mostró un incremento significativo de los niveles de células totales respecto al control *naive* (N). Los tratamientos no resultaron tener un efecto en este parámetro.

Figura 7: Conteo número total de células del BAL de los distintos grupos experimentales: (A+Lip: asmáticos tratados con Vehículo; A+NAC: Asmáticos tratados con NAC; A+Nac-Lip: asmáticos tratados con NAC/liposoma) y controles (N, normal; A: asmático)



1.3.2 Anticuerpos séricos específicos para el alérgeno

Los desórdenes atópicos como el asma se caracterizan por presentar altos niveles séricos de IgE, IgG1 específicos para el alérgeno (Holgate & Douglass, 2013). Decimos entonces, a partir de los sueros de los animales, medir los niveles de dichos anticuerpos.

En la figura 8A se observan los niveles séricos para los anticuerpos IgE específicos contra OVA. Como era de esperar, los grupos expuestos al protocolo experimental de inducción de asma incrementaron los niveles de IgE respecto al control *naive* (N). Sin embargo, ninguno de los tratamientos restablece los valores normales de IgE.

Por otro lado, en la figura 8B se observan los niveles séricos del anticuerpo IgG1 específicos contra OVA, se registró un incremento de este anticuerpo en todos los grupos respecto al *naive* y los dos tratamientos no muestran efecto en los niveles de este anticuerpo.

En conclusión, el esquema de tratamientos que se diseñó no logró generar un efecto en la respuesta humoral antígeno específica.

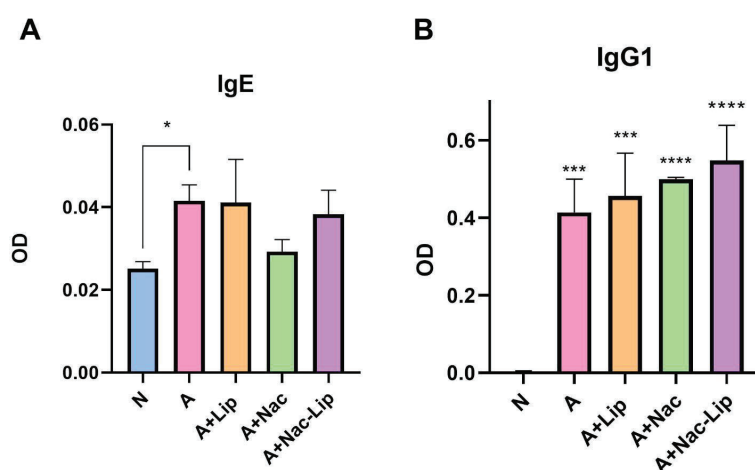


Figura 8: A) Niveles de anticuerpos IgE suero específicos contra OVA en los distintos grupos experimentales (A +Lip : Asma + Vehículo; A +NAC: Asma + NAC; A +Nac-Lip: Asma + Nac-Vehículo) y controles (N: Naive; A: Asma) **B)** Niveles de anticuerpos IgG1 en suero contra OVA para los mismos grupos. Eje Y (OD: densidad óptica). Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori ($p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) respecto el control naive

1.3.3 Perfil de expresión de citoquinas

1.3.3.1 Expresión de citoquinas a nivel local (pulmón)

Para evaluar la respuesta local a nivel del pulmón de los tratamientos se realizaron lavados broncoalveolares. A partir de los mismos, se midieron los niveles de expresión de distintas citoquinas. Como se mencionó en la introducción, las respuestas alérgicas están orquestadas principalmente por linfocitos Th2. Dichos linfocitos producen gran cantidad de citoquinas del tipo Th2 como IL-4 e IL-5, por lo que en la patología alérgica se esperan elevados niveles en dichas citoquinas en los BAL. Con el fin de estudiar el perfil de la respuesta celular, se midieron las citoquinas del tipo Th2 (IL-4 o IL-5), tipo Th1 (IFN- γ) y respuesta regulatoria (IL-10) en el BAL de los diferentes grupos experimentales.

En la figura 9A, se puede observar que no hubo diferencias en los niveles de IFN- γ para los distintos grupos experimentales y controles. Cuando se analiza la respuesta regulatoria, en la figura 9C no se observa diferencia entre los grupos. Por otro lado, como se esperaba para la respuesta Th2, se registró un incremento significativo de la expresión de IL-5 en el control asmático (A) respecto al control *naive* (N). Cuando se analiza el efecto de los tratamientos sobre el perfil Th2, ninguno de los tratamientos tuvo efectos significativos sobre los niveles de IL-5. Sin embargo, como se observa en la figura 9B hay una tendencia de reducción de los niveles de IL-5 en el grupo tratado con Nac-Lip.

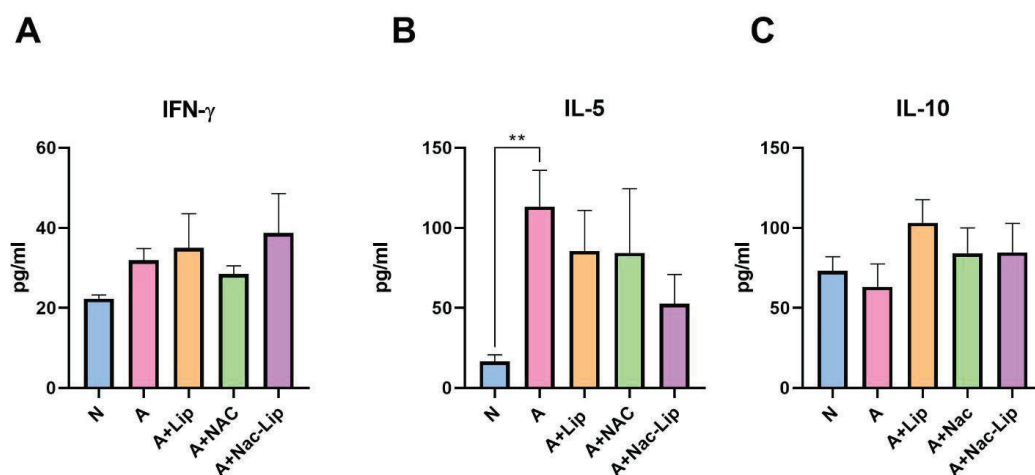


Figura 9: Niveles de *citoquinas en BAL* para los siguientes grupos experimentales (**A +Lip** : Asma + Vehículo; **A +NAC**: Asma + NAC; **A +Nac-Lip**: Asma + Nac-Vehículo) y controles (**N**: Naive; **A**: Asma). **(A)** niveles de IFN- γ . **(B)** niveles IL-5. **(C)** niveles de IL-10. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (** $p < 0,005$)

1.3.3.2 Expresión de citoquinas a nivel sistémico

Para evaluar el efecto sistémico de los tratamientos, se realizó un cultivo de esplenocitos y a partir del sobrenadante obtenido de este cultivo se midieron los niveles de citoquinas involucradas en la respuesta inmune. Se realizaron dos estimaciones de las poblaciones linfocitarias presentes en el bazo de los animales. Por un lado, se llevó adelante una estimulación específica con el alérgeno (OVA) del modelo de asma y, por otro lado, se realizó una estimulación inespecífica de las células T (ConA).

Para determinar la respuesta Th1, se midió la citoquina proinflamatoria IFN- γ . Cuando se llevó adelante una estimulación específica (OVA), no se detectaron diferencias significativas en los niveles de esta citoquina entre los diferentes grupos experimentales (Figura 10A). No obstante, cuando se estimularon los linfocitos T de manera inespecífica, se observó en el grupo asmático mayores niveles de IFN- γ en comparación al normal (N) y comparables con los observados en el control vehículo (A+ Lip). Además, se observaron menores niveles de IFN- γ en los grupos tratados con NAC cuando se realizó una estimulación inespecífica (ConA). Interesantemente, solo el grupo tratado con la formulación Nac-Lip muestra niveles significativamente menores al control asmático (Figura 10D). Lo que indicaría que el tratamiento de NAC encapsulada tendría un efecto sobre el perfil de respuesta Th1.

Con el fin de evaluar el perfil Th2 se midió la citoquina IL-4, se muestran los resultados en OD para la estimulación con OVA en la figura 10B. Sorprendentemente, el grupo asmático o el vehículo no muestran mayores niveles de IL-4 que el grupo control. Sin embargo, se registró una disminución

significativa en los niveles de dicho mediador inflamatorio en el grupo tratado con la formulación Nac-Lip respecto al control vehículo (A+Lip).

Cuando se analizan los resultados de la estimulación inespecífica (Figura 10E), el grupo asmático (A) y el tratado con vehículo (A+ Lip) presentan valores similares de citoquina mayores que el control *naive* (N) estos son valores esperados. Al analizar los tratamientos, se observa que los niveles de IL-4 disminuyen significativamente tanto para el tratamiento con NAC como con NAC-Liposoma. Esto nos indicaría que ambos tratamientos tendrían un efecto sobre el perfil de respuesta Th2.

Como citoquina antiinflamatoria se midió IL-10. Se muestran los resultados para las células estimuladas con OVA en la figura 10C. No se observan diferencias entre los distintos grupos experimentales. Mientras que los resultados para la estimulación inespecífica se encuentran en la figura 10F. Se observa una tendencia a menores niveles de IL-10 en el tratamiento de Nac-Lip, similar al normal, respecto al control asmático (A). Esta tendencia se vuelve significativa cuando se lo compara con el grupo asmático tratado con el vehículo (A+Lip).

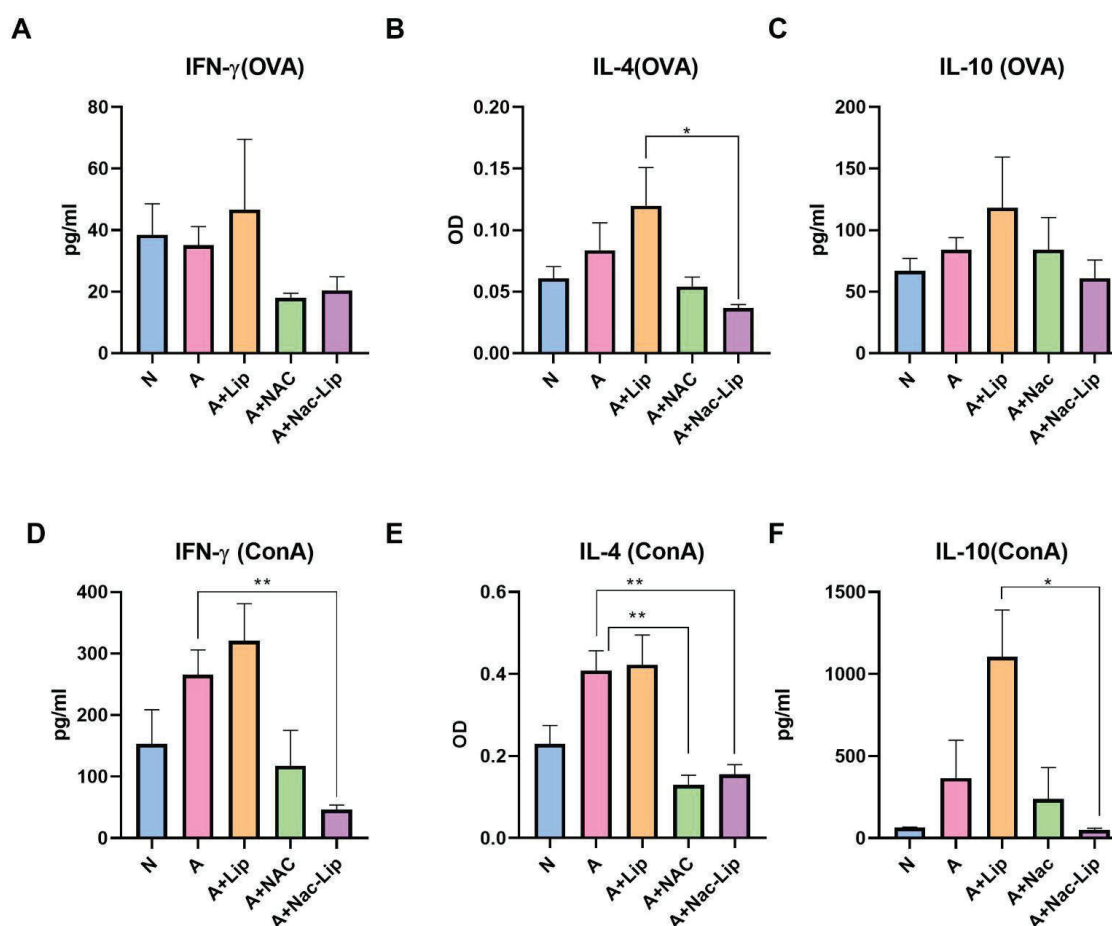


Figura 10: Niveles de citoquinas en cultivos de esplenócitos estimulados con 40 ug/pocillo de antígeno específico del modelo de asma (OVA) y estimulación inespecífica con mitógeno T (ConA) para los siguientes grupos experimentales (A +Lip : Asma + Vehículo; A +NAC: Asma + NAC; A +Nac-Lip: Asma + Nac-Vehículo) y controles (N: Naive; A: Asma). (A, D) niveles de IFN-γ. (B, E) niveles IL-4. (C, F) niveles de IL-10. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

1.3.4 Histopatología pulmonar

Se analizó el efecto de los tratamientos en la histopatología. Como se mencionó en la introducción, los pulmones con un fenotipo asmático tienen un aumento en el infiltrado celular y en la cantidad de células productoras de mucus. Para observar estos indicadores, se analizaron secciones transversales de pulmones que fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E). Como se puede observar en la tinción H&E de la figura 11, hubo un incremento notorio del infiltrado celular peribronquial y perivascular en los ratones expuestos al modelo de asma. Cuando se incluyen los tratamientos, si bien se observa una disminución en el infiltrado inflamatorio, el mismo siguió presente y distó de la histología característica de un ratón sano.

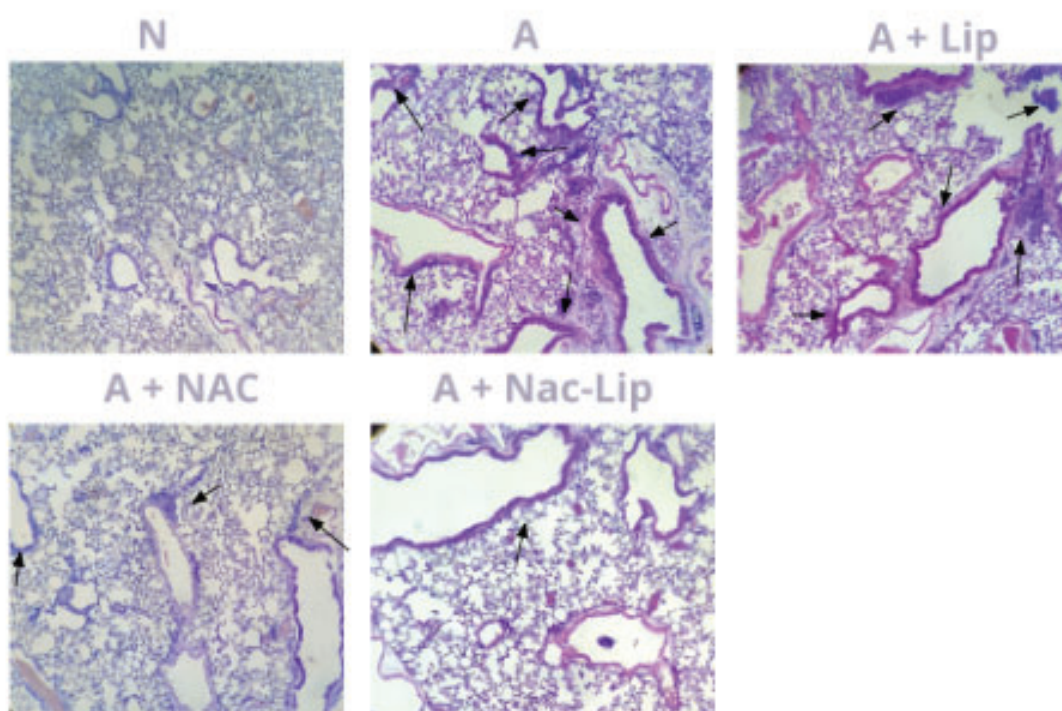


Figura 11: Histología de secciones pulmonares y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina. Las **flechas negras** indican infiltrado celular. Se muestra una fotografía de una muestra representativa de los siguientes grupos experimentales (**A +NAC:** Asma + NAC; **A +Nac-Lip:** Asma + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **A:** Asma; **A +Lip :** Asma + Vehículo) con un aumento original de 100X

A fin de analizar la producción de mucus se realizaron tinciones con PAS, esta tinción permite identificar estructuras que contienen altas concentraciones de hidratos de carbono, en este caso el mucus producido por las células caliciformes presentes en los bronquiolos. La tinción de PAS muestra en una coloración rosada-fucsia a las células caliciformes. Como se puede observar en la figura 12, existe presencia de coloración fucsia alrededor de las vías aéreas en los cortes provenientes del grupo asmático (A) y control vehículo (A+Lip), lo que indicaría un aumento en la cantidad de mucus, así como también una hipertrofia e hiperplasia de las células caliciformes respecto del control *naive* (N). Cuando se observan los cortes histológicos provenientes a los grupos tratados con NAC, se puede observar una clara disminución de la coloración fucsia, es decir, de la producción de mucus indicando que el tratamiento convencional tendría efectos mucolíticos como se esperaba. Aun así, se sigue observando

diferencias con los cortes histológicos provenientes del control *naive* (N). Por otro lado, cuando se procede a analizar los grupos tratados con la formulación Nac-Lip, se observa una disminución de la coloración fucsia aún mayor que la observada con el tratamiento convencional, llegando a registrar secciones del pulmón donde la histopatología del pulmón se restaura por completo a niveles comparables con la observada en el control *naive* (N), es decir no se registra coloración fucsia.

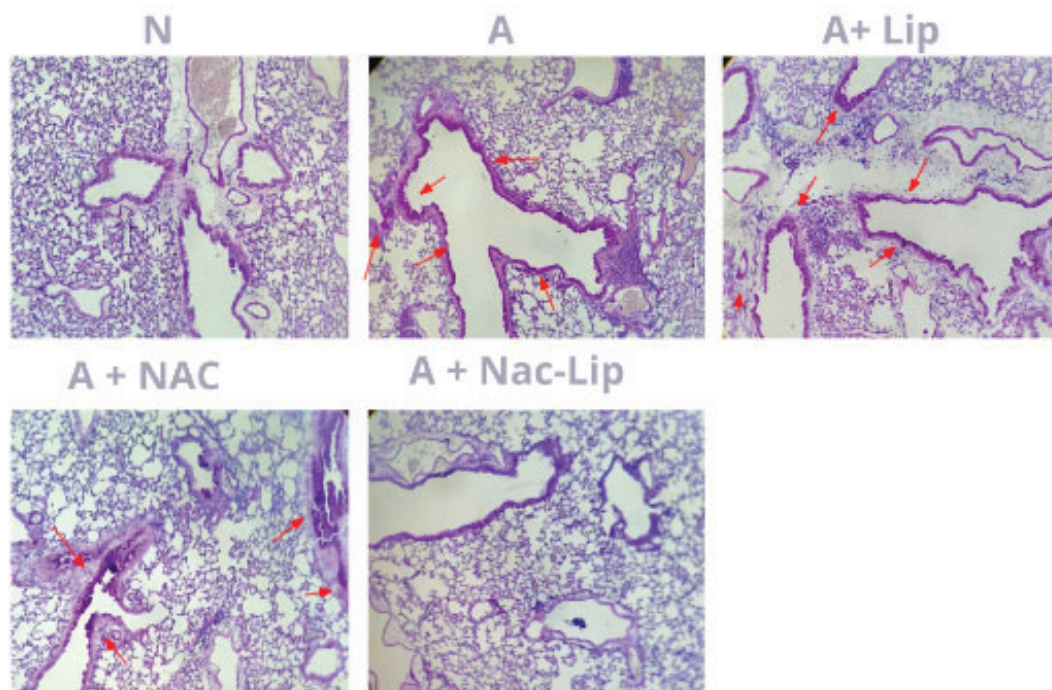


Figura 12: Histología de pulmón y posterior tinción con PAS. Las **flechas rojas** indican presencia de células productoras de mucus. Se muestra una fotografía de una muestra representativa de cada los siguientes grupos experimentales (**A +NAC:** Asma + NAC; **A +Nac-Lip:** Asma + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **A:** Asma; **A +Lip:** Asma + Vehículo) con un aumento original de 100X

Para respaldar dichas observaciones se efectuó un análisis semicuantitativo del grado de infiltrado celular y la cantidad de células productoras de mucus. Los resultados para el índice de filtrado se observan en la figura 13B. Como se esperaba, en los ratones expuestos al modelo de asma hay un incremento en el infiltrado celular perivascular y peribronquial comparable al observado en el control vehículo (A+Lip), por lo que el liposoma *per se* no tendría efecto en los niveles de infiltrado pulmonar. Cuando se analiza los tratamientos, se observa una tendencia a menores niveles de infiltrados para el grupo tratado con NAC convencional pero interesantemente solo el grupo tratado con Nac-Lip es significativamente distinto al control asmático (A). Es decir, la formulación liposomal, modula los niveles de infiltrado inflamatorio de manera más eficiente que los efectos observados por la formulación convencional de NAC.

Por otro lado, el índice de mucus indica el número de células productoras de mucus que se encuentran presentes en las vías aéreas y se puede observar en la figura 13A. Analizando los resultados, se observa un aumento significativo en la producción de mucus en los grupos expuestos al modelo experimental de asma y el control vehículo. Cuando se administró los tratamientos, este aumento disminuyó considerablemente para los dos tratamientos, pero esta disminución solo logra ser significativa en el grupo tratado con la formulación de NAC junto a los liposomas. Realizando un análisis

comparativo entre los tratamientos, la formulación Nac-Lip logró una mayor restauración de los niveles normales de producción de mucus por lo que se puede concluir que la formulación NAC liposomal a base de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar potenciaría el efecto mucolítico del NAC.

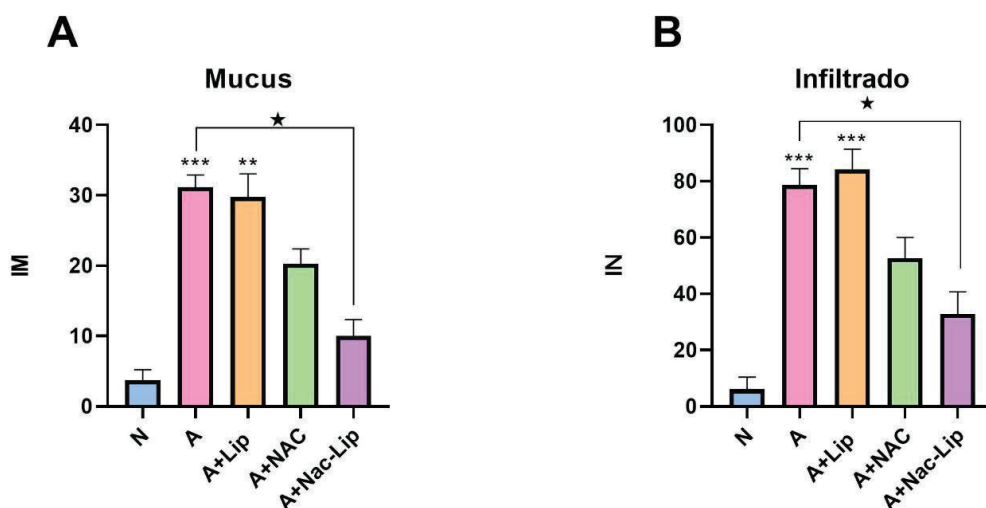


Figura 13: Análisis semicuantitativo a partir de los cortes histológicos. A partir de la tinción realizada con Hematoxilina-Eosina se calculó **(A)** El índice de mucus (IM) se calculó en secciones transversales de pulmón teñidas con PAS, observando 10 vías aéreas y categorizando la abundancia de células productoras de mucus (0: menor a 5% de células, 1: entre 5 y 25%; 2: entre 25 y 50%; 3: entre 50 y 75%; 4: mayor a 75%). El índice para cada muestra se calculó como el promedio del índice de abundancia de mucus entre las 10 vías para los mismos grupos experimentales (**A+Lip**: Asma + Vehículo; **A+NAC**: Asma + NAC; **A+Nac-Lip**: Asma + Nac-Vehículo) y controles (**N**: Naive; **A**: Asma). **(B)** Índice de producción de filtrado (IN) se obtuvo al clasificar de acuerdo al grado de severidad (0: normal; 1: mayor igual que 1 y menor que 4 células de espesor; 2: mayor igual que 4 y menor que 10; 3: menor igual que 10 y mayor que 15; 4: mayor igual que 15) y la representación de cada grado de severidad (extensión) en el preparado (0: menor a 5%; 1: mayor igual a 5 y menor a 25%; 2, menor igual a 25 y mayor a 50%; 3: mayor igual a 50 y menor a 75%; 4: mayor a 75%). El índice se calculó como la sumatoria de la multiplicación entre el grado de severidad y su extensión en el preparado para los mismos grupos. Test de Kruskal-Wallis con Dunn's a posteriori (** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$) respecto al control Naive y (★ $p < 0,05$) respecto al control asmático

2. Modelo de Fibrosis

2.1 Protocolo experimental

Parte del trabajo de esta tesis de grado se basó en el establecimiento de un protocolo experimental de inducción de fibrosis pulmonar en murinos. Existen actualmente múltiples modelos murinos de fibrosis pulmonar, el modelo de inducción por administración de BLM en una única dosis es el más caracterizado y que simula varios aspectos claves de la patología humana (Liu et al., 2017). El uso generalizado del modelo de inducción por BLM y su sencillez nos impulsó a elegirlo para la presente tesis de licenciatura. Además, se eligió la aspiración orofaríngea como vía de administración de BLM, debido a que esta opción es sencilla y poco invasiva.

Como se mencionó anteriormente, el tiempo de evaluación de fenotipo fibrótico en el modelo experimental es un factor crucial a determinar. Con el objetivo de poder observar tanto los mediadores inflamatorios como los mediadores fibróticos se seleccionó la fase de transición que comprende entre 7-14 días post administración. En particular se decidió realizar el análisis, el día 14 post administración

BLM ya que varios autores reportaron altos niveles de indicadores fibróticos como TGF- β y depósito de colágeno en los pulmones (Barbayanni et al., 2018; Walters & Kleeberger, 2008).

A la hora de diseñar el esquema de tratamiento, se debe tener en cuenta que según el momento de administración del compuesto, se puede clasificar el tratamiento en preventivo o terapéutico. Si se busca observar los efectos antioxidantes se debe administrar el medicamento durante la fase temprana, es decir, previo a la administración de BLM o durante la fase inflamatoria del modelo, este tipo de tratamiento se va a categorizar como "tratamiento preventivo", mientras que si se administra durante la fase fibrótica del modelo, se consideraría "terapéutico". Con el objetivo de evaluar el potencial antioxidante y como agente antiinflamatorio de la formulación NAC/liposomas se optó por administrar los tratamientos en la fase temprana. De esta manera, se establece el protocolo experimental detallado en la figura 4 de la sección de materiales y métodos.

2.1.1 Selección de concentración de BLM

Un factor importante a considerar es la dosis de BLM a administrar para inducir fibrosis pulmonar. La literatura informa una amplia gama de dosis de BLM para la inducción de fibrosis y además como la vía de administración elegida es relativamente reciente, uno de los parámetros a establecer será la concentración de BLM. Por bibliografía se acotó el intervalo de concentración a testear de 0,8-2 U/kg (Barbayanni et al., 2018; Liu et al., 2017; Walters & Kleeberger, 2008).

La concentración de BLM más comúnmente reportada para la inducción de fibrosis es 2 U/kg por lo que se realizó un ensayo piloto con un n=16 (4/grupo) con el objetivo de evaluar el fenotipo producto de una dosis de BLM 2U/kg. Sin embargo, a partir del día 1 post administración, se empezaron a registrar muertes hasta el día 4 en donde por cuestiones de bioética, se decidió frenar el experimento, ya que se había registrado la pérdida del 50 % de los animales como se muestra la curva de sobrevivencia en la figura 14. Debido a la disminución del número de individuos, los resultados obtenidos en el análisis del BAL, sangre y conteo de células dieron con mucha dispersión y no se pudieron obtener resultados concluyentes de los mismos. Por este motivo, se decidió reducir la dosis de BLM basándonos en el trabajo de Barbayannidon *et al*, donde reportan que si bien dosis iguales o superiores a 2 U/kg generan un fenotipo fibrótico también registran una alta tasa de mortalidad concluyendo que la concentración 0,8 U/kg es la más apta, ya que registra una baja tasa de mortalidad conservando el fenotipo fibrótico (Barbayanni et al., 2018).

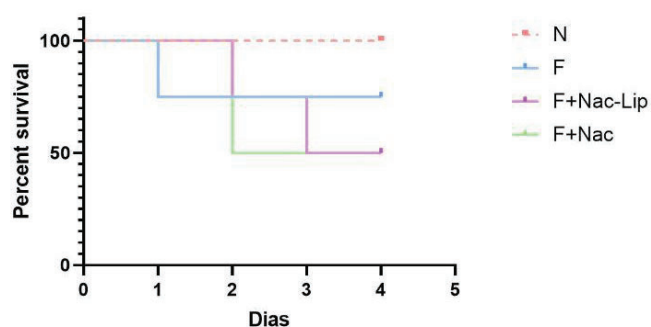


Figura 14: Curva de sobrevivencia (kaplan-Meier plot) para los distintos grupos experimentales (**F + NAC:** Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip:** Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **F:** Fibrosis) post administración de BLM.

2.2 Registro del bienestar de los ratones

Con las consideraciones previas y siguiendo el protocolo experimental detallado en la sección de materiales y métodos, se llevó a cabo el primer ensayo. Diversos estudios reportan la pérdida de peso como un indicador tradicional de este modelo (Bale et al., 2016; Barbayianni et al., 2018), por lo cual se registraron los pesos de los animales, para monitorear el estado físico de los mismos. El resultado se puede observar en la figura 15, después del protocolo de fibrosis se registró una caída en el peso de los animales hasta el día 8 post tratamiento. No se observó diferencia entre el control fibrótico y los grupos experimentales, ya que todos registran un descenso del peso significativo si se los compara con el control *naive*. Por lo que en principio, los tratamientos no muestran un efecto sobre la pérdida de peso.

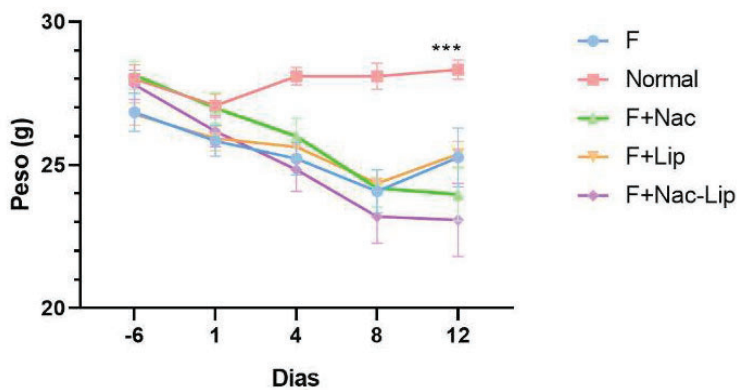


Figura 15: Registro de los pesos en gramos de los ratones de cada grupo experimentales (**F +Lip:** Fibrosis + Vehículo; **F + NAC:** Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip:** Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **F:** Fibrosis) previo y post administración de BLM. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (***) $p < 0,001$ respecto al control naive

Para analizar el comportamiento de los animales expuestos al modelo de inducción de fibrosis pulmonar se realizó un ensayo de *Open field*. Se midieron parámetros tales como la distancia recorrida durante el ensayo. Como se observa en la figura 16A, los grupos a los cuales se administró BLM, muestran una disminución en la distancia recorrida respecto al control *naive* (N), este parámetro se relaciona estrechamente con el estado físico de los ratones, una disminución del mismo indica un deterioro del estado físico de los animales. Además, se observó una disminución significativa en el número de veces en las que el ratón permaneció en bipedestación (*Rearing*) (Figura 16C) y en la cantidad de veces que el ratón contactó la pared con ambas patas delanteras (*Climbing*) (Figura 16B) en los grupos expuestos al protocolo de inducción de fibrosis pulmonar respecto al control *naive* (N). En conclusión, la administración de BLM genera cambios en el comportamiento, ensayos como el *Open field* podrían servir como indicador no invasivo de que la administración de BLM se hizo correctamente.

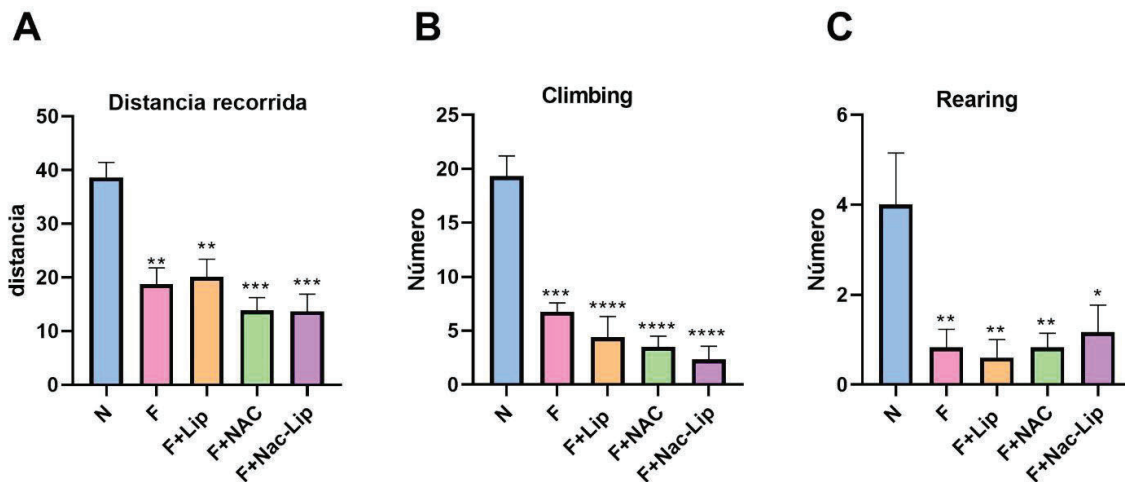


Figura 16: Análisis de parámetros de comportamiento mediante un ensayo de tipo Open Field sobre grupos experimentales (F +Lip: Fibrosis + Vehículo; F + NAC: Fibrosis + NAC; F +Nac-Lip: Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (N: Naive; F: Fibrosis). **A)** distancia recorrida medida en cuadro de la grilla. **B)** Número de climbing. **C)** Número de Rearing. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) respecto al control Naive

2.3 Análisis del fenotipo fibrótico

2.3.1 Células en BAL

Durante el establecimiento de la fibrosis pulmonar se produce una expansión de distintas poblaciones celulares, por lo que se espera registrar un aumento en número total de células en los BAL en los ratones expuestos al modelo de inducción de fibrosis pulmonar. Para obtener este dato, se realizó un conteo del número total de células en el BAL diferenciando las células polimorfonucleares, se decidió realizar esta distinción porque los neutrófilos cumplen un rol muy importante en el establecimiento del fenotipo fibrótico. En la figura 17A, se observa que todos los grupos a excepción del grupo de control vehículo (F+Lip) presentaron un incremento significativo en el número total de células respecto al grupo *naive* (N). Cuando se analiza la población polimorfonuclear (Figura 17B), se observa un incremento significativo para los grupos control fibrótico (F) y vehículo (F+Lip). Esto permite concluir que el aumento en el número total de células presentes en los BAL en estos controles se debe a un aumento en las células polimorfonucleares como la población de neutrófilos. Además, las células polimorfonucleares no explican el aumento en el número total de células de los grupos tratados con los tratamientos de NAC y Nac-Lip, por lo que se puede deducir que en estos grupos experimentales hay expansión de otras poblaciones celulares.

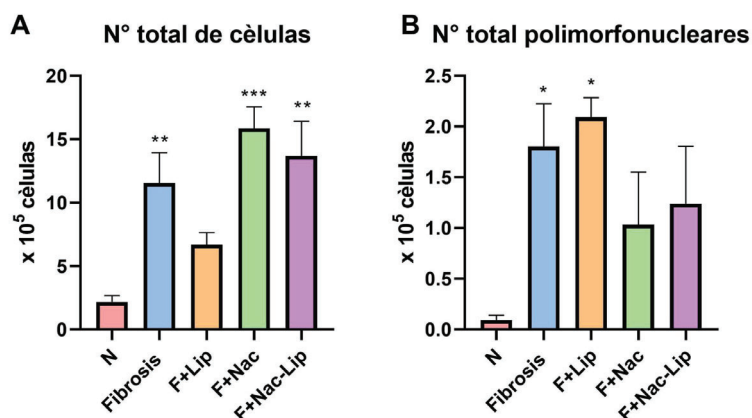


Figura 17: (A) Conteo **número total de células del BAL** de los distintos grupos experimentales (**F +Lip**: Fibrosis + Vehículo; **F + NAC**: Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip**: Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N**: Naive; **F**: Fibrosis) (B) Conteo de **células polimorfonucleares en BAL** de los distintos grupos experimentales y controles. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$) respecto al control Naive

2.3.2 Cultivo de esplenocitos

Si bien el rol del sistema inmune en el desarrollo de la fibrosis pulmonar es dinámico y depende de la etapa de evaluación del fenotipo, se sabe que la fibrosis pulmonar altera el perfil de expresión de citoquinas (Desai et al., 2018). Con el objetivo de registrar cómo se altera este perfil de expresión y si los tratamientos ensayados modulan la respuesta inmune, se realizó un cultivo *ex vivo* de esplenocitos. Se evaluó IL-4, IL-12 y TNF- α como mediador inflamatorio. Durante el cultivo celular se llevó a cabo una estimulación específica de la población linfocitaria T, con un mitógeno T (ConA), los resultados para esta estimulación se muestran en la figura 18 (A-C). Como se observa en la figura, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ninguna citoquina entre los diferentes grupos. Por otro lado, también se realizó una estimulación inespecífica con PMA y ionomicina, para estimular todas las poblaciones inmunitarias, en este caso tampoco se encontró diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las citoquinas.

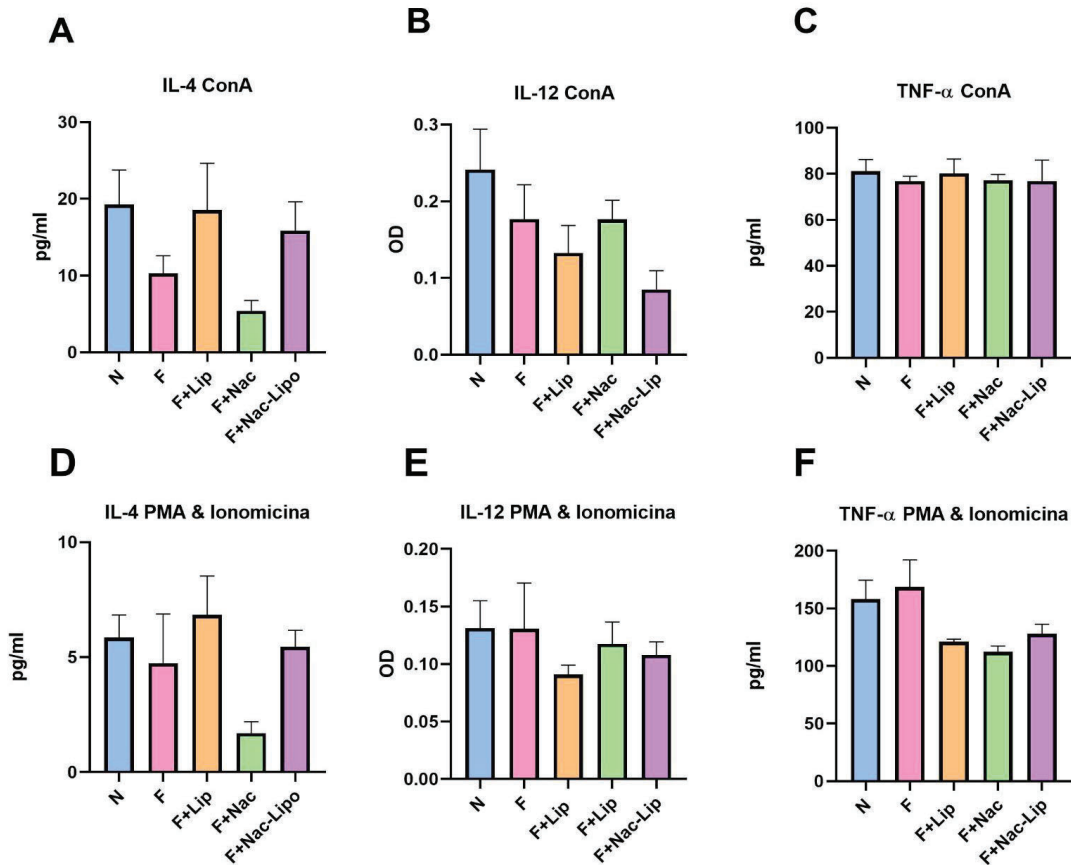


Figura 18: Niveles de *citoquinas en cultivos de esplenocitos* estimulados con mitógeno T (ConA) y estimulación inespecífica con PMA y Ionomicina para los siguientes grupos experimentales (F +NAC: Fibrosis + NAC; F +Nac-Lip: Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (N: Naive; F: Fibrosis ; F +Lip : Fibrosis + Vehículo). (A, D) niveles de IL-4. (B, E) niveles IL-12. (C, F) niveles de TNF-α.

2.3.3 Histología pulmonar

Con el propósito de examinar el efecto de los tratamientos sobre la histopatología, se procedió a realizar cortes histológicos de los pulmones de los distintos grupos experimentales y controles, para posteriormente teñirlos. La aplicación de la tinción de H&E permitió la visualización de la arquitectura pulmonar y la identificación de cualquier infiltrado presente. La PFI a nivel histológico presenta una remodelación fibrótica del parénquima pulmonar con presencia de focos fibróticos y cicatrización destructiva, también se caracteriza por la presencia de una estructura conocida como "panal de abeja", la cual consiste en espacios aéreos agrandados rodeados de densas cicatrices y revestidos por epitelio bronquiolar, todas estas características descritas se ilustran en la figura 19, las cuales fueron observadas para el grupo expuesto a la administración de BLM. Como se puede observar, la histopatología de la fibrosis pulmonar es mucho más agresiva.

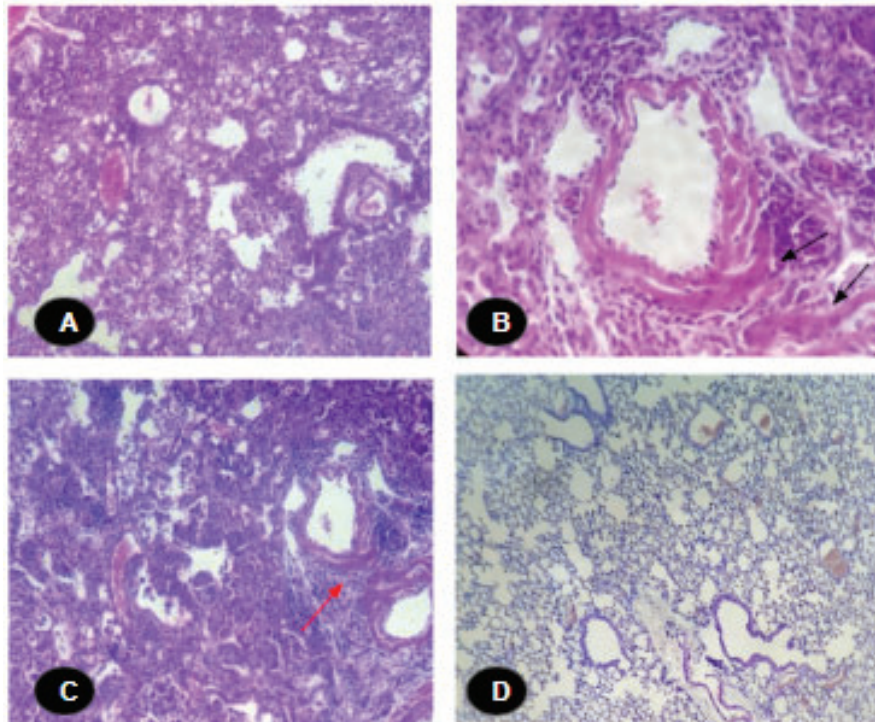


Figura 19: Histología de pulmón y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina del **control fibrótico (F)**, se muestran cambios histopatológicos comunes de la FPI. **A)** Imagen con un aumento original de 100X, se muestra la destrucción de la estructura alveolar y pérdida de la estructura pulmonar normal. **B)** Se muestra presencia de focos fibróticos (flechas negras) con depósito de MEC en un aumento de 400x. **C)** Se ilustra la estructura de “panal de abeja” (flecha roja), espacios aéreos agrandados rodeados de densas cicatrices con un aumento de 100x. **D)** Se ilustra una imagen representativa de una histología teñida con Hematoxilina-Eosina de un pulmón naive (N) con un aumento de 100X para comparación.

Como se muestra en la figura 20, se puede visualizar la alteración de la arquitectura pulmonar, con una distorsión total de la estructura alveolar. Además, se identificó un infiltrado celular profuso en las vías aéreas. En contraste, los pulmones de los ratones del grupo control *naive* (N) presentan una arquitectura pulmonar normal, sin evidencia de cicatrización destructiva y con una estructura alveolar conservada y uniforme. Sin embargo, se registró un leve infiltrado inflamatorio, posiblemente debido a la exposición de los ratones normales a la administración orofaríngea con solución fisiológica. Por otro lado, el grupo control vehículo también muestra un infiltrado pulmonar abundante y una distorsión de la arquitectura pulmonar similar a la observada en el grupo control fibrótico. En los grupos experimentales tratados con NAC, se pudo observar un notable infiltrado inflamatorio y una alteración en la arquitectura pulmonar, sin embargo, se logró distinguir la presencia de alvéolos a diferencia del control fibrótico en donde casi no se puede distinguir estas estructuras. Por otro lado, en el grupo experimental tratado con la formulación Nac-Lip, se registró una ligera disminución del infiltrado celular. En general, se pudo apreciar una arquitectura pulmonar heterogénea con lesiones pulmonares, aunque se observó una mejor conservación de la estructura alveolar.

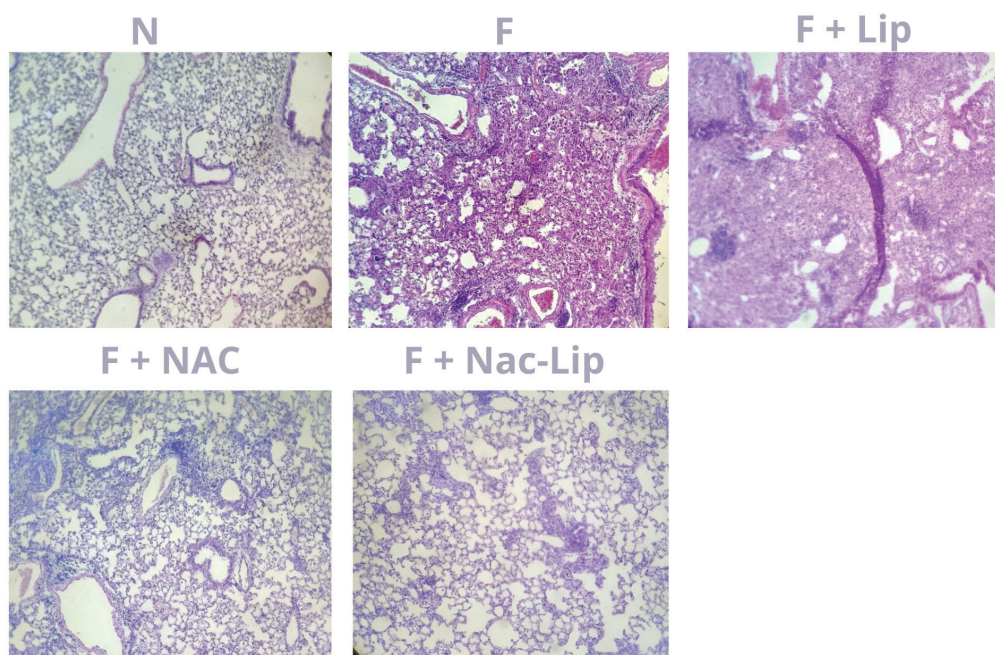


Figura 20: Histología de pulmón y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina. Se muestra una fotografía de una muestra representativa de los siguientes grupos experimentales (**F +NAC:** Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip:** Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **F:** Fibrosis; **F +Lip :** Fibrosis + Vehículo) con un aumento original de 100X.

También se realizó tinción de rojo sirio para evaluar el grado de fibrosis. Esta tinción tiene la particularidad de colorear las fibras de colágeno de rojo y el citoplasma o fibras musculares en amarillo. Como se puede observar en la figura 21, en los ratones control *naive* (N) no se evidencia la presencia de colágeno de los alvéolos lo cual es esperable porque en condiciones normales en los septos interalveolares más finos no hay tejido conectivo. En los animales expuestos al modelo de fibrosis se observa abundante depósito de colágeno alrededor de los alvéolos lo cual indica la presencia de fibrosis. En el control vehículo (F+Lip) se observaron niveles similares de colágeno pero cuando se administran los tratamientos parecerían disminuir los depósitos de colágeno en los septos interalveolares. Este efecto se ve particularmente en los ratones tratados con Nac-Lip.

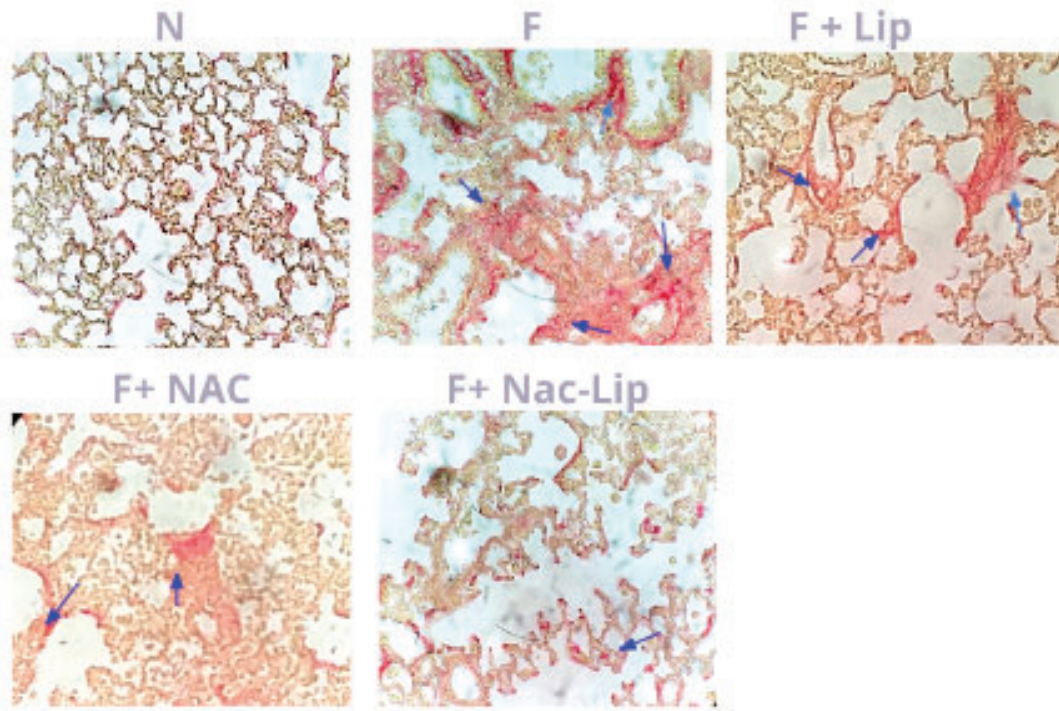


Figura 21: Histología de pulmón y posterior tinción con Rojo Sirio. Las **flechas azules** indican zonas con depósito de colágeno . Se muestra una fotografía de una muestra representativa de los siguientes grupos experimentales (**F +NAC:** Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip:** Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **F:** Fibrosis ; **F +Lip :** Fibrosis + Vehículo) con un aumento original de 400X

Para corroborar los hallazgos observados en las histologías de H&E, se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el sistema de clasificación semicuantitativo de Ashcroft modificado (Hübner et al., 2008). Cada corte histológico fue evaluado individualmente para determinar la gravedad de la fibrosis intersticial y se le asignó una puntuación entre 0 y 8 utilizando una escala preestablecida enunciada por Hubner *et la*. Los resultados para el score de Ashcroft modificado se muestran en la figura 22A. Se puede observar, un incremento significativo en el score de Ashcroft para el control fibrótico (F) y control vehículo (F+Lip) respecto al control *naive* (N), es decir, el grado de fibrosis es mayor. Por otro lado, cuando se administra, tanto el tratamiento convencional (NAC) como la formulación liposomal (Nac-Lip) se observa una tendencia con índices más bajos a los observados en el control fibrótico (F) pero ninguno de los tratamientos logró disminuir el grado de fibrosis a los valores normales.

Por otro lado, se cuantificó el área coloreada (colágeno) en los cortes histológicos teñidos con rojo sirio, los resultados se muestran en la figura 22B. Es evidente el aumento en el depósito de colágeno en los controles fibrótico (F) y vehículo (F+ Lip), ambos tratamientos muestran una disminución en los niveles de colágeno pero ninguno de los tratamientos logró restaurar el fenotipo normal.

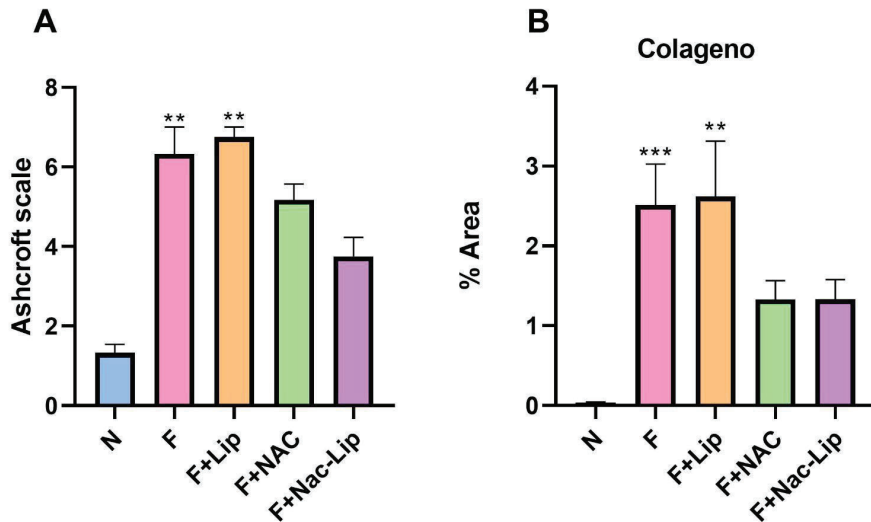


Figura 22: Análisis semicuantitativo de las histologías de pulmón de los grupos experimentales (**F+NAC**: Fibrosis + NAC; **F+Nac-Lip**: Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N**: Naive; **F**: Fibrosis; **F+Lip**: Fibrosis + Vehículo). **A)** Puntuación de los cortes histológicos según la escala de Ashcroft modificado (escala del 0-8). **B)** Cuantificación del porcentaje de área coloreada de rojo (colágeno) respecto al área total de imágenes tomadas a 400x. Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$) respecto al control Naive

2.3.4 Medición de indicadores de daño pulmonar y marcadores fibróticos

Por último, se midieron indicadores que se ven aumentados durante la patología pulmonar. El desarrollo de la fibrosis pulmonar está asociado con muerte celular y un incremento de los niveles de ROS (Cantin et al., 1987), por esto se midieron indicadores de daño pulmonar como la presencia de proteínas en los BAL (Figura 23A). Como se esperaba, se registró un incremento de proteínas totales de todos los grupos expuestos al modelo de inducción de fibrosis pulmonar por administración de BLM y los tratamientos no disminuyen este indicador de daño pulmonar.

Por otro lado, se midieron los niveles de LDH en suero, si los niveles de esta enzima en sangre son elevados puede indicar daño tisular producto de una enfermedad o lesión crónica (Drent et al., 1996). En la figura 23B se observan los resultados, de estos se puede decir que a excepción del grupo tratado con Nac-Lip, todos los grupos tratados con BLM muestran un incremento significativo de LDH respecto al control *naive*.

Por último, se evaluaron los niveles de mieloperoxidasa (MPO), esta es una enzima que se almacena en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares y es secretada al medio extracelular ante diversos estímulos nocivos. La mayoría de los pacientes con FPI tenían niveles elevados de MPO (Cantin et al., 1987). Los resultados se muestran en la figura 23C, el control fibrótico y vehículo muestran un incremento en los niveles de MPO. Cuando se analiza el efecto de los tratamientos sobre los niveles de MPO, ambos tratamientos con NAC redujeron los niveles de MPO, pero solo el tratamiento con Nac-Lip logra una reducción significativa respecto al control fibrótico.

Un mediador clave de la fibrosis pulmonar es el TGF- β , ya que la secreción de este factor estimula la acumulación de colágeno y matriz extracelular en el pulmón. Aunque no significativo, los niveles de TGF- β tienden a ser mayores en los ratones con fibrosis pulmonar respecto a los ratones *naive*.

Interesantemente, solo el tratamiento con Nac-Lip disminuye significativamente los valores de TGF- β en pulmón.

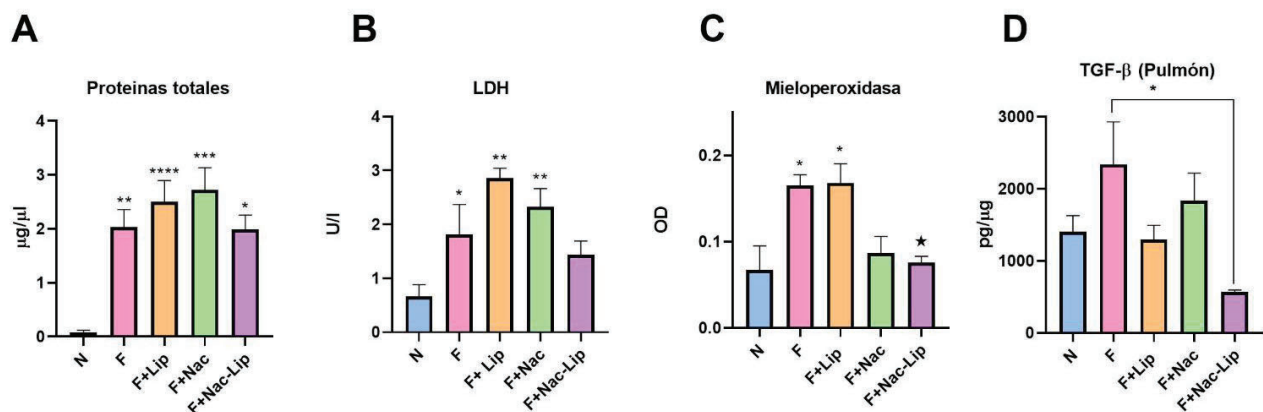


Figura 23: Medición de marcadores de fibrosis pulmonar. **A)** Cuantificación de proteína total en BAL **B)** Cuantificación de Lactato deshidrogenasa en suero **C)** Niveles de mieloperoxidasa en BAL. **D)** Niveles de TGF- β en extracto proteico de pulmón relativizado con concentración de proteínas totales para los siguientes grupos experimentales (**F +NAC:** Fibrosis + NAC; **F +Nac-Lip:** Fibrosis + Nac-Vehículo) y controles (**N:** Naive; **F:** Fibrosis; **F +Lip :** Fibrosis + Vehículo). Análisis estadístico test de ANOVA con Turkey a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) respecto al control Naive y (★ $p < 0,05$) respecto al control fibrótico.

Discusión

Las enfermedades respiratorias han ido en aumento y las opciones terapéuticas para tratarlas y controlar sus síntomas son limitadas (Clark et al., 2022). Existe una necesidad de generar nuevos tratamientos contra estas afecciones. La N-acetilcisteína es una droga ampliamente usada por sus propiedades mucolíticas, antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, su baja biodisponibilidad limita su aplicación y efectividad (Bonanomi & Gazzaniga, 1980; Borgström et al., 1986). En este trabajo proponemos que el encapsulamiento de esta droga en liposomas constituidos por fosfolípidos del surfactante pulmonar podría aumentar su efectividad para tratar el asma y la fibrosis pulmonar.

Los liposomas son estructuras esféricas que se forman espontáneamente cuando los lípidos se dispersan en un medio acuoso (Pradhan et al., 2015). Se los ha empleado ampliamente como sistemas de encapsulamiento para *delivery* de drogas (Antimisiaris et al., 2021). En este trabajo empleamos liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar de mamíferos.

El tamaño y la forma de las partículas liposomales son variables importantes de caracterizar porque van a determinar la capacidad de carga, su estado coloidal y la captación celular (Hoshyar et al., 2016). Respecto a la caracterización de las partículas liposomales empleadas en este trabajo por el tipo de metodología con las que se las obtuvo podemos inferir que tienen un diámetro de alrededor de 100 nm. Esto es lo esperado para vesículas unilaminares obtenidas por extrusión múltiple mediante membranas de 100 nm. Lo que está en línea con lo observado previamente por el grupo de la Dra. Nadia Chiaramoni en liposomas de composición similar (Bujan et al., 2020).

Si bien en este trabajo no se muestran ensayos de forma o distribución de tamaños, podemos afirmar que estamos trabajando con liposomas esféricos, dado que los tres tipos de lípidos del surfactante pulmonar empleados para su composición son fosfatidilcolinas. Este tipo de moléculas presentan forma cilíndrica, formando estructuras de bicapas lipídicas, las cuales se autoensamblan en vesículas esféricas al ser dispersadas en agua (van Rooijen & van Nieuwmegen, 1980).

En paralelo a los ensayos presentados en este trabajo, se trató de caracterizar las partículas mediante la técnica de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS). Esta técnica tiene la ventaja de que permite conocer la distribución de tamaños en una mezcla compleja, y además permitiría conocer la carga interna o superficial de NAC en los liposomas empleados. Para esto se empleó el equipo de SAXS de nuestro instituto. Se realizaron mediciones preliminares de 3 horas de las partículas liposomales vacías o cargadas con NAC suspendidas en PBS. Sin embargo, cuando se hizo un análisis inicial de los resultados obtenidos no se observaron patrones diferenciales entre las muestras. Si bien restaría realizar un análisis más exhaustivo, la experiencia del ensayo nos inclina a pensar que deberíamos repetir las mediciones empleando el equipo de SAXS en su mayor configuración (6,5 metros frente a los 2,5 metros ensayados) y además deberíamos tener a los liposomas en una solución más viscosa que evite su decantación durante las largas horas de medición. Por esto se planea repetir este ensayo con una solución de liposomas suspendidos en una solución saturada de sacarosa. Como la sacarosa posee mayor densidad creemos que esto limitará la movilidad de los liposomas mejorando las condiciones de medición.

Mientras que el laboratorio de Inmunología, Vacunas y Alergias de la UNSAM se encuentra abocado a evaluar estas formulaciones terapéuticas *in vivo*, el laboratorio de Bionanotecnología de la

UNQ se encuentra abocado a la optimización de la obtención y caracterización de los liposomas ensayados. En este sentido, el laboratorio de la Dra. Nadia Chiaramoni actualmente está analizando el porcentaje de encapsulación de la NAC mediante la técnica de microdiálisis. Si bien todavía no se obtuvieron resultados concluyentes de estos ensayos, por cómo es la metodología de obtención de liposomas y dado que no son dializados luego de su generación, se puede inferir que la NAC se encontraría tanto libre en solución como encapsulada y en la superficie de los liposomas. Para dilucidar cuál de las disposiciones de la NAC, libre, superficial o encapsulado, está contribuyendo a la terapia o si es un efecto combinado, es necesario realizar más ensayos evaluando las tres configuraciones de forma individual.

Cuando se postula un nuevo sistema de *delivery* para su uso *in vivo*, es necesario probar que no produzca mayor toxicidad *per se*. Si bien en la presente tesis no realizamos estudios de citotoxicidad, en general los liposomas han mostrado ser vehículos seguros, convirtiéndolos en uno de los principales sistemas de *delivery* utilizados en la clínica (Antimisiaris et al., 2021). En particular, para la síntesis de liposomas utilizados en este trabajo, se emplearon fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar. Al tratarse de compuestos presentes naturalmente en el pulmón, consideramos que no se debería producir citotoxicidad en las concentraciones empleadas. En este sentido, en ensayos de viabilidad celular *in vitro* con MTT, la Dra. Nadia Chiaramoni reportó que liposomas similares a los empleados en este trabajo a base de surfactantes pulmonares no afectan la viabilidad celular (Bujan et al., 2020). Con este antecedente, y sumado a que *in vivo* no observamos el incremento de ninguno de los indicadores de lesión pulmonar en los ratones tratados con el vehículo respecto a los ratones con patología respiratoria, resulta lógico pensar que la formulación liposomal empleada no presenta aumento de la citotoxicidad, al menos, en las concentraciones ensayadas. Aun así, resulta necesario realizar estudios de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* para evaluar si efectivamente esta formulación liposomal es segura.

El objetivo general de este estudio fue evaluar el potencial terapéutico de la NAC co-administrada con liposomas a base de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar en ensayos preclínicos. Para evaluar esto se decidió emplear dos modelos de patologías respiratorias diferentes. Por un lado, se eligió llevar a cabo una evaluación del potencial terapéutico de la formulación de Nac-Lip en un modelo experimental de asma murino y fibrosis pulmonar inducida por BLM.

Se seleccionó la vía intranasal como vía de administración de los tratamientos debido a sus numerosas ventajas. En primer lugar, su aplicación en la clínica es sencilla gracias al uso de atomizadores intranasales, lo que la convierte en una forma de administración no invasiva y sencilla, con una excelente tolerabilidad y buena adhesión al tratamiento. Además, la cavidad nasal es un entorno inmunogénico por lo que no se requiere esterilización de las preparaciones en oposición a las rutas parenterales (Pires et al., 2009). Por otro lado, la absorción intranasal permite evitar el metabolismo presistémico gastrointestinal y hepático, lo que aumenta la biodisponibilidad de los fármacos (Pires et al., 2009). Sin embargo, si bien la administración nasal presenta muchas ventajas, actualmente no es la vía de administración más común. Esto se debe en gran parte a que la absorción del fármaco por la cavidad nasal implica todo un desafío. La mucosidad junto con la depuración mucociliar, mecanismo de autolimpieza de los bronquios, dificultan la absorción de fármacos polares, como es el caso de la NAC (Merkus et al., 1998). Por otro lado, la cavidad nasal tiene la capacidad de metabolizar fármacos

mediante mecanismos enzimáticos defensivos, lo que puede reducir la estabilidad biológica de los fármacos administrados (Pires et al., 2009). Para superar estas dificultades existen múltiples estrategias en estudio. Como se explicó ampliamente en la introducción, en este sentido los liposomas son una prometedora estrategia de *delivery* para una administración intranasal de distintos fármacos (Jain et al., 2007; Law et al., 2001; V. H. Lee et al., 1991; Muramatsu et al., 1999). Por estos motivos, a pesar de que pocos trabajos seleccionan la vía de administración intranasal para estudiar el potencial de NAC en la patología respiratoria, se decidió utilizar esta vía de administración para evaluar si la formulación de NAC encapsulada en liposomas puede superar las barreras fisiológicas y fisicoquímicas de la cavidad nasal.

Se decidió evaluar las formulaciones en un **modelo de asma murino** debido a que se lo emplea de rutina en nuestro laboratorio, por lo que contamos con la capacidad técnica y el equipamiento necesarios para llevar a cabo la evaluación de manera efectiva. Además, este modelo presenta una inflamación alérgica pulmonar, por lo que permite probar el efecto antiinflamatorio de la NAC. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, NAC es un potente mucolítico, y este modelo nos permite evaluar su capacidad para reducir el depósito de mucus en las vías aéreas (A. Soto et al., 2022; A. S. Soto et al., 2017; Zappia et al., 2019).

Como se mencionó con anterioridad, en los ensayos clínicos no se observaron mejoras en el tratamiento de pacientes con asma al añadir NAC al tratamiento convencional (Aliyali et al., 2010). Estos resultados se deben posiblemente a la baja biodisponibilidad de la NAC cuando se la administra por vía oral (Borgström et al., 1986).

Si bien existen en la literatura algunos reportes preclínicos donde se demostró un efecto positivo del tratamiento con NAC (Eftekhari et al., 2013), es importante señalar que en todos estos ensayos, la administración de la NAC era preventiva, es decir, se administraba antes de establecer el fenotipo asmático. Esta forma de administración permite observar los efectos protectores y antioxidantes del fármaco, pero no es apropiada para evaluar su potencial terapéutico en la reducción de los parámetros del fenotipo asmático, como la producción de mucus (Moeller et al., 2008). **De manera novedosa y a pesar de que representaba un mayor desafío se diseñó un esquema de administración terapéutico de cuatro días de tratamiento posterior al establecimiento del fenotipo asmático.**

Nos propusimos como primer objetivo la evaluación del potencial terapéutico de la formulación Nac-Lip y su comparación con la formulación convencional de NAC en el modelo de asma. Al analizar los resultados en conjunto podemos observar que no hubo efecto de los tratamientos NAC y NAC-Lip en algunos parámetros de la patología. Este es el caso del número total de células en BAL en el que no se observó una disminución del número total de células. En contraste con nuestros resultados, Mitsopoulos & Suntres observaron una disminución en el número total de células en BAL en respuesta al tratamiento con NAC (Mitsopoulos & Suntres, 2011). Sin embargo, esto lo observaron usando un esquema preventivo de tratamiento (Mitsopoulos & Suntres, 2011). Si bien el aumento del número total de células es una característica del asma, no es un parámetro específico de la misma. Por lo que sería interesante evaluar si existen diferencias entre las poblaciones celulares presentes en BAL entre los distintos grupos experimentales. En este sentido, poblaciones con un perfil regulatorio podrían tener efectos positivos en la patología pulmonar mientras que un incremento en poblaciones celulares como

los eosinófilos tendrían efectos negativos. Para caracterizar mejor a las células en BAL inicialmente nos propusimos hacer un conteo diferencial mediante el uso de una citocentrífuga, pero desperfectos en la misma nos impidieron llevar adelante la medición. A futuro sería interesante evaluar las poblaciones celulares en BAL por citometría de flujo.

El modelo experimental de asma utilizado en este trabajo emplea el antígeno OVA lo que nos permite medir la respuesta inmune específica. Cuando se midió la respuesta humoral específica, ninguno de los tratamientos muestra un efecto sobre la misma. No es posible contrastar este resultado con otros autores dado que, según nuestro conocimiento, no se han reportado evaluación de respuesta humoral para el tratamiento con NAC en modelos asma. De todas formas, consideramos que un esquema de tratamiento agudo a nivel local como el ensayo no alcanzaría a causar cambios en los niveles séricos de anticuerpos.

El perfil de expresión de citoquinas nos da una idea de la respuesta T montada. En este trabajo se midieron los niveles de citoquinas a nivel local en los BAL, solo se observa una tendencia en la disminución de los niveles de IL-5 por parte de la formulación liposomal. Esto va en correlación con lo reportado en los esquemas de administración preventiva de NAC, ya que el trabajo de Lee *et al*, no se reporta un efecto en los niveles de IL-10 (respuesta regulatoria) y TNF- α manteniendo los niveles similares al control asmático (P.-H. Lee et al., 2020). Por otro lado, sí se reporta una disminución de los niveles de citoquinas Th2 pero en esquemas de administración preventiva de NAC (Song et al., 2021). Cabe aclarar que la medición de citoquinas en BAL es compleja porque las citoquinas son propensas a la degradación por proteasas. Por lo que en futuras mediciones sería beneficioso agregar un inhibidor de proteasas durante el proceso de recolección de los lavados broncoalveolares. Esperamos que esta modificación en el protocolo nos permita disminuir la dispersión y vuelva a las tendencias significativas. De esta forma, si bien en el modelo experimental desarrollado en este trabajo se observa solamente una tendencia y debieran ser confirmadas con nuevos ensayos, podrían sugerir que la formulación liposomal NAC modularía la respuesta Th2 a nivel local.

Para observar los efectos sistémicos de los tratamientos en la respuesta T se realizó un cultivo de esplenocitos. Se observó una respuesta sistémica positiva para la estimulación T inespecífica (ConA). La formulación liposomal de NAC logró disminuir de manera significativa ambas respuestas Th1 y Th2. El hecho de que tratamientos terapéuticos agudos a nivel local puedan afectar la respuesta T a nivel sistémico nos sorprendió, por lo que sería interesante realizar ensayos de seguimiento de la partícula liposomal marcada. Los liposomas empleados en este trabajo tendrían un rango de tamaño compatible con la posibilidad de extravasación al torrente sanguíneo (Hoshyar et al., 2016). Los ensayos de seguimiento de liposomas nos permitirían dilucidar si este efecto es producto de que los liposomas extravasan al sistema circulatorio o de que el NAC libre llega a nivel sistémico.

Por otro lado, al llevar adelante una estimulación T alérgico-específica de los esplenocitos no se observaron cambios en la expresión de citoquinas. En este caso suponemos que hubo un error en la estimulación, posiblemente durante la preparación del antígeno OVA para los cultivos *ex vivos*, dado que es un protocolo que se encuentra puesto a punto en el laboratorio y los controles asmáticos reportan siempre valores mucho más elevados de las tres citoquinas ensayadas, por lo que planeamos repetir este ensayo a futuro.

Sorprendentemente, los dos tratamientos muestran tener efectos en los niveles de infiltrado inflamatorio, pero solo se registró una disminución significativa de este parámetro para el tratamiento con la formulación liposomal. **Estos resultados nos dan un indicio que el *delivery* de NAC a base de liposomas, potenciaría la actividad antiinflamatoria del NAC, reduciendo los niveles de infiltrado celular en los pulmones. Como se mencionó anteriormente, se decidió evaluar la formulación liposomal en un modelo de asma para observar el potencial mucolítico de esta formulación. Este es el primer trabajo, que mediante una administración terapéutica de la formulación liposomal de NAC logra obtener una disminución significativa del depósito de mucus en el pulmón respecto al control asmático.**

Como segunda patología respiratoria se decidió emplear la **fibrosis pulmonar idiopática**. Para cumplir con el segundo objetivo de este trabajo de tesina, buscamos en primer lugar establecer un modelo murino de fibrosis pulmonar que permita recapitular varias características de la patología humana y nos permita testear el potencial terapéutico de la formulación de NAC encapsulada en liposomas. Se eligió esta patología para evaluar la formulación de NAC dado que actualmente en la clínica se emplea esta droga vía oral para su tratamiento (Sun et al., 2016). Además, si bien todavía se desconoce la etiología de la enfermedad, la fibrosis pulmonar se caracteriza por un incremento en los niveles de ROS y un marcado daño tisular (Cantin et al., 1987). Por esto en particular, esta patología permite evaluar el potencial antioxidante de la formulación Nac-Lip.

Es importante mencionar, las diferencias entre las dos patologías seleccionadas para la evaluación de la formulación Nac-Lip. Por un lado, el asma atópico es una patología caracterizada por una hipersensibilización del tipo Th2 (Paul & Zhu, 2010) mientras que el rol del sistema inmune en la FPI todavía es debatido; sin embargo, se observa un incremento en citoquinas de un perfil Th1 y los mecanismos desregulados en esta patología son distintos a los alterados en el asma (Cantin et al., 1987; Mei et al., 2022), por lo que testear la formulación de Nac-Lip en estas dos patologías le da robustez a este trabajo. Como se mencionó en la introducción existen múltiples modelos murinos de inducción de fibrosis pulmonar, el seleccionado en este trabajo fue la inducción de fibrosis pulmonar vía administración de BLM por una única dosis. Este modelo tiene validez clínica y permite recapitular varios aspectos de la patología humana.

Además, se seleccionó administrar la BLM vía aspiración orofaríngea, debido a su sencillez y disminución de la mortalidad (Liu et al., 2017; Moeller et al., 2008; Walters & Kleeberger, 2008). En estudios realizados por Barbayianni *et al*, se compararon dos formas de administración de BLM la aspiración orofaríngea y la administración intratraqueal (IT) (Barbayianni et al., 2018). En este trabajo, se observó que ambas formas de administración del fármaco dieron como resultado una pérdida de peso de los ratones expuestos al modelo en comparación con los ratones tratados con PBS, lo cual es un indicador tradicional de lesión inducida por el modelo (Barbayianni et al., 2018). Para validar, el modelo de inducción de fibrosis pulmonar puesto a punto durante el desarrollo de este trabajo de tesina se midió el peso de los animales junto con otros indicadores característicos de la patología. En este sentido, como era de esperar, se observó una pérdida de peso en los ratones expuestos a BLM.

Como resultado de la administración de BLM, múltiples autores reportan un incremento en el recuento total de células presentes en BAL en comparación con los grupos control a los cuales no se administró el fármaco (Cortijo et al., 2001; Hagiwara et al., 2000; Yildirim et al., 2005). Este incremento se debe a una respuesta inflamatoria pulmonar. Nuestros resultados muestran también un aumento en el número total de células presentes en BAL, lo que indica que se ha logrado cumplir con este indicador. El incremento observado se atribuye principalmente al aumento en el porcentaje de neutrófilos reportado tanto en los modelos murinos de fibrosis pulmonar idiopática mediante la administración BLM, como en la sangre de pacientes que padecen de FPI (Desai et al., 2018). En línea con esto, el protocolo experimental desarrollado para este estudio cumple con este indicador, ya que el aumento en el número total de células presentes en el BAL se debe a un incremento en la población celular polimorfonuclear, la cual está compuesta principalmente por neutrófilos.

La administración de BLM produce una lesión pulmonar recapitulando la histopatología característica observada en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Múltiples autores reportan cambios histopatológicos a partir de la segunda semana post administración de BLM, se reportan focos fibróticos con presencia de abundante infiltrado celular y destrucción de la estructura alveolar (Cavazza et al., 2010; Hagiwara et al., 2000; Yildirim et al., 2005). En este trabajo, las tinciones con H&E mostraron una estructura pulmonar severamente dañada, con una total pérdida de la arquitectura alveolar y abundante infiltrado celular. Para estimar la gravedad de la fibrosis se puede utilizar el *score* de Ashcroft modificado. Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la puntuación de los cortes histológicos pertenecientes a los grupos expuestos a la administración de BLM comparable a los valores esperados para este modelo experimental (Barbayianni et al., 2018). La alteración en la estructura pulmonar en los pacientes con FPI, se debe a incrementos en el depósito de la ECM y colágeno en los septos alveolares (Kinoshita & Goto, 2019). El modelo establecido en este trabajo cumple con este indicador, ya que se observó un incremento de los niveles de colágeno en los septos alveolares observados en los cortes histológicos.

Por otro lado, el modelo experimental de inducción de fibrosis pulmonar a través de la administración de BLM ha sido asociado con el aumento de múltiples indicadores de lesión pulmonar y estrés oxidativo en estudios previos (Barbayianni et al., 2018; Teixeira et al., 2008; Yildirim et al., 2005). Entre los más comúnmente informados por varios autores, destaca el aumento significativo de proteínas en los lavados broncoalveolares, un indicador común de lesión pulmonar. En el presente trabajo se ha observado un aumento en los niveles de este parámetro, así como en otros indicadores comunes de daño asociados a fibrosis pulmonar, como son los niveles de lactato deshidrogenasa en suero y mieloperoxidasa en BAL. Asimismo, se observó un incremento de los niveles de mieloperoxidasa en BAL. Sin embargo, al observar los niveles de TGF- β , un regulador maestro de la remodelación tisular, se observó una tendencia a mayores niveles aunque no resultaron significativos. Consideramos que esto se debe a la dispersión asociada al protocolo de extracción de proteínas totales del pulmón, por lo que creemos que un aumento del número de muestras volvería a esta tendencia en una diferencia estadísticamente significativa.

En conjunto, estos resultados demuestran que pudimos establecer de forma exitosa un modelo murino experimental de inducción de fibrosis pulmonar vía administración BLM que recapitula varios

indicadores de la patología humana. Este logro no solamente repercute en la presente tesis de licenciatura, sino que aumenta las capacidades científicas tecnológicas del laboratorio para evaluar diferentes hipótesis y tratamientos experimentales a futuras.

Establecido el modelo murino experimental de fibrosis pulmonar, nos propusimos como siguiente objetivo la evaluación del potencial terapéutico de la formulación Nac-Lip en comparación con la formulación convencional de NAC. Para cumplir con este objetivo, se diseñó un esquema de tratamientos preventivos y se evaluaron indicadores clásicos de la patología.

Ninguno de los tratamientos mostró tener un efecto en la pérdida de peso ni en el cambio de comportamiento, ambos producto de la administración de BLM. De acuerdo con nuestro conocimiento, no hay estudios preclínicos donde se evalúe el efecto de la NAC sobre estos indicadores. Por otro lado, todas las variables donde los tratamientos demostraron tener un efecto se evaluaron a los 14 días, mientras que el registro del peso se realizó hasta el día 8 y el ensayo de comportamiento al cuarto día post administración de BLM, sería interesante medir el estado físico de los animales al mismo tiempo que se analizaron el resto de los parámetros en los que se detectó efecto terapéutico.

Por otro lado, al igual que en los ensayos realizados en asma, los tratamientos no demostraron tener un efecto sobre el número total de células en BAL, ya que no se observó una disminución de este indicador. Esto está en línea con muchos trabajos donde se evaluó el potencial de la NAC en modelos murino de fibrosis pulmonar y no se observó una disminución en el número total de células presentes en BAL incluso con esquemas de tratamiento de hasta 60 días (Cortijo et al., 2001; Teixeira et al., 2008). En este sentido, es lógico que un esquema de 4 dosis de tratamiento no logré modificar este indicador. Además, se puede afirmar que este aumento en número total de células no se debe a un incremento en las poblaciones polimorfonucleares. Esto nos indicaría, que no hay un incremento en los neutrófilos, una de las poblaciones más importante en el establecimiento de la fibrosis pulmonar, por lo que sería interesante estudiar por citometría de flujo qué poblaciones celulares son responsables de este aumento en los grupos tratados.

No se observaron cambios en el perfil de expresión de citoquinas en cultivos de esplenocitos. Creemos que esto se debe al tiempo de evaluación del fenotipo fibrótico porque la primera semana post administración de BLM es la etapa inflamatoria, los niveles de estas citoquinas se midieron al día 14 cuando los indicadores inflamatorios disminuyen y los pro-fibróticos se encuentran en aumento (Moeller et al., 2008). En el trabajo de Serrano-Mollar *et al* se evaluó el efecto de NAC en un modelo de inducción de FPI por administración de BLM, se midieron los cambios a lo largo del tiempo en los niveles del TNF- α , IL-1 β y IL-6. Los autores observan aumento de los niveles de las tres citoquinas en BAL durante la primera semana post administración. Al día 15 días post administración de BLM, solo TNF- α mostró niveles elevados de BAL respecto al control *naive* (Serrano-Mollar et al., 2003). Sorprendentemente, nosotros tampoco observamos un incremento de esta citoquina en el cultivo de esplenocitos, esto podría deberse a que la respuesta inducida por la BLM sea local y en el periodo de evaluación no exista un cambio en la respuesta sistémica (bazo). Además, esto podría estar relacionado con el hecho que este modelo está dado por el uso de un fármaco y no se emplean antígenos proteicos contra los que se pueda montar una respuesta T específica.

El TGF- β es el principal mediador del depósito de colágeno y MEC en general en los pulmones. En este trabajo solamente se observó una disminución significativa de los niveles de TGF- β en el grupo experimental tratado con la formulación liposomal respecto al control fibrótico. Es importante destacar que estos resultados se obtuvieron con solo 4 dosis de tratamiento. Si bien se ha reportado previamente un efecto de reducción de los niveles de TGF- β , este efecto se observa con un esquema de administración de NAC de 14 días (Kulshrestha et al., 2020). En correlación con estos resultados, esperábamos que la formulación Nac-Lip reduzca más el depósito de colágeno en el pulmón en comparación con la formulación convencional de NAC. Sorprendentemente, los dos tratamientos mostraron tener un efecto similar en el depósito de colágeno en pulmón. Por esto resultaría interesante, probar esquemas de administración de NAC más extensos y evaluar si los tratamientos muestran diferencias en este parámetro.

La formulación liposomal demostró incrementar el potencial antioxidante del N-acetilcisteína, esto se puede observar en la modulación de los indicadores de lesión pulmonar. En este sentido, se observa una disminución significativa de los niveles de mieloperoxidasa en pulmón. Asimismo, es el único grupo que no registró un aumento de los niveles séricos de LDH. Especulamos con que esta disminución en el daño pulmonar observado en indicadores de lesión y en las histologías pulmonares, podría ser consecuencia del efecto antioxidante directo e indirecto del NAC, particularmente a su capacidad de incrementar los niveles de GSH, uno de los principales antioxidantes del cuerpo. Por lo que sería interesante a futuro medir los niveles de GSH y el balance oxidativo en general.

Recapitulando, si bien en la mayoría de los parámetros evaluados en el modelo de fibrosis no se observa una clara diferencia entre el tratamiento con NAC y Nac-Lip existen algunos indicios que nos podrían hablar de una mayor efectividad de este último. El tratamiento con Nac-Lip fue el único capaz de disminuir significativamente los niveles de mieloperoxidasa y TGF- β , al mismo tiempo que evitó el aumento de los niveles séricos de LDH. Por otro lado, al evaluar el tratamiento en el modelo de asma la reducción del mucus y el infiltrado celular solamente fue significativa con esta formulación. En conjunto, estos hallazgos evidencian el potencial mucolítico, antiinflamatorio y antioxidante de la formulación NAC encapsulada en liposomas a base de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Además, el hecho de haber obtenido resultados positivos en ambas enfermedades evaluadas en este estudio, fortalece aún más la validez de estos resultados. Esto nos impulsa a llevar adelante nuevos ensayos preclínicos con distintas concentraciones de esta formulación y abren la puerta hacia la medicina traslacional.

Conclusiones

Primer objetivo:

Evaluar el potencial terapéutico de N-acetilcisteína encapsulado en liposomas en un modelo de asma murino.

- La formulación liposomal es la única que logra modular ambas respuesta Th1/Th2 a nivel sistémico
- Solo la formulación liposomal disminuye significativamente el índice de infiltrado pulmonar respecto el control asmático demostrando el potencial antiinflamatorio de la formulación liposomal
- Este es el primer trabajo reporta un esquema terapéutico de una formulación de NAC logra obtener una disminución significativa del depósito de mucus en el pulmón respecto al control asmático, esto demuestra el potencial mucolítico de la formulación liposomal

Segundo Objetivo:

A) Establecer un modelo murino de fibrosis pulmonar mediante la administración de bleomicina vía orofaríngea.

- Se estableció de forma exitosa un modelo murino experimental de inducción de fibrosis pulmonar vía administración BLM que recapitula y cumple con varios de los indicadores de la patología humana.

B) Evaluar el potencial terapéutico de los N-acetilcisteína encapsulado en liposomas en un modelo de fibrosis.

- La formulación liposomal logró disminuir indicadores de lesión pulmonar asociados a daño oxidativo (mieloperoxidasa/LDH) demostrando su potencial antioxidante de esta formulación

En resumen, como conclusión final del trabajo, todos estos hallazgos evidencian el potencial mucolítico, antiinflamatorio y antioxidante de la formulación NAC asociada a liposomas a base de fosfolípidos presentes en el surfactante pulmonar para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Bibliografía

1. Abid, S. H., Malhotra, V., & Perry, M. C. (2001). Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. *Current Opinion in Oncology*, 13(4), 242.
2. Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., & Bally, M. B. (2005). The Liposomal Formulation of Doxorubicin. In *Methods in Enzymology* (Vol. 391, pp. 71–97). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91004-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91004-5)
3. Åkerlund, B., Jarstrand, C., Lindeke, B., Sönnnerborg, A., Åkerblad, A.-C., & Rasool, O. (1996). Effect of N-acetylcysteine(NAC) treatment on HIV-1 infection: A double-blind placebo-controlled trial. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50(6), 457–461. <https://doi.org/10.1007/s002280050140>
4. Aliyali, M., Amiri, A. P., Sharifpoor, A., & Zalli, F. (2010). Effects of N-Acetylcysteine on Asthma Exacerbation. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 103–109.
5. American Thoracic Society & European Respiratory Society. (2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(2), 277–304. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>
6. Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., & Flavell, R. A. (2004). Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. *Cell*, 117(4), 515–526. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00451-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00451-9)
7. Antimisariis, S. G., Marazioti, A., Kannavou, M., Natsaridis, E., Gkartziou, F., Kogkos, G., & Mourtas, S. (2021). Overcoming barriers by local drug delivery with liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174, 53–86. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.019>
8. Arias, S. J., Neffen, H., Bossio, J. C., Calabrese, C. A., Videla, A. J., Armando, G. A., & Antó, J. M. (2018). Prevalencia y características clínicas del asma en adultos jóvenes en zonas urbanas de Argentina. *Archivos de Bronconeumología*, 54(3), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.08.021>
9. Bale, S., Sunkoju, M., Reddy, S. S., Swamy, V., & Godugu, C. (2016). Oropharyngeal aspiration of bleomycin: An alternative experimental model of pulmonary fibrosis developed in Swiss mice. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(6), 643–648. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.194859>
10. Ballester, B., Milara, J., & Cortijo, J. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms20030593>
11. Balsamo, R., Lanata, L., & Egan, C. G. (2010). Mucoactive drugs. *European Respiratory Review*, 19(116), 127–133. <https://doi.org/10.1183/09059180.00003510>
12. Barbayianni, I., Ninou, I., Tzouvelekis, A., & Aidinis, V. (2018). Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00269>
13. Baumgartner, K. B., Samet, J. M., Stidley, C. A., Colby, T. V., & Waldron, J. A. (1997). Cigarette smoking: A risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(1), 242–248. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.1.9001319>
14. Bernhard, W. (2016). Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 208, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.08.003>
15. Bonanomi, L., & Gazzaniga, A. (1980). Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement*, 111, 45–51.
16. Borgström, L., Kågedal, B., & Paulsen, O. (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 31(2), 217–222. <https://doi.org/10.1007/BF00606662>
17. Boulet, L.-P., Reddel, H. K., Bateman, E., Pedersen, S., FitzGerald, J. M., & O’Byrne, P. M. (2019). The Global Initiative for Asthma (GINA): 25 years later. *European Respiratory Journal*, 54(2). <https://doi.org/10.1183/13993003.00598-2019>
18. Brown, K. K., & Raghu, G. (2004). Medical treatment for pulmonary fibrosis: Current trends, concepts, and prospects. *Clinics in Chest Medicine*, 25(4), 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2004.08.003>
19. Bujan, A., Alonso, S. del V., & Chiaramoni, N. S. (2020). Lipopolymers and lipids from lung surfactants in association with N-acetyl-l-cysteine: Characterization and cytotoxicity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 231, 104936. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104936>

20. Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
21. Bush, A. (2019). Pathophysiological Mechanisms of Asthma. *Frontiers in Pediatrics*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00068>
22. Cantin, A. M., North, S. L., Fells, G. A., Hubbard, R. C., & Crystal, R. G. (1987). Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(6), 1665–1673. <https://doi.org/10.1172/JCI113005>
23. Cavazza, A., Rossi, G., Carbonelli, C., Spaggiari, L., Paci, M., & Roggeri, A. (2010). The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: An update. *Respiratory Medicine*, 104 Suppl 1, S11–22. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.013>
24. Ceconi, C., Currello, S., Cargnoni, A., Ferrari, R., Albertini, A., & Visioli, O. (1988). The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: Effects of N-acetyl cysteine. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 20(1), 5–13. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(88\)80174-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(88)80174-3)
25. Chaudhary, N. I., Roth, G. J., Hilberg, F., Müller-Quernheim, J., Prasse, A., Zissel, G., Schnapp, A., & Park, J. E. (2007). Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *European Respiratory Journal*, 29(5), 976–985. <https://doi.org/10.1183/09031936.00152106>
26. Chen, X., Huang, W., Wong, B. C., Yin, L., Wong, Y. F., Xu, M., & Yang, Z. (2012). Liposomes prolong the therapeutic effect of anti-asthmatic medication via pulmonary delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1139–1148. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28011>
27. Chennakesavulu, S., Mishra, A., Sudheer, A., Sowmya, C., Suryaprakash Reddy, C., & Bhargav, E. (2018). Pulmonary delivery of liposomal dry powder inhaler formulation for effective treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.005>
28. Clark, J., Kochovska, S., & Currow, D. C. (2022). Burden of respiratory problems in low-income and middle-income countries. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 16(4), 210–215. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000615>
29. Committee, B. T. S. R. (1985). Oral N-acetylcysteine and exacerbation rates in patients with chronic bronchitis and severe airway obstruction. *Thorax*, 40, 832–835.
30. Cortijo, J., Cerdá-Nicolás, M., Serrano, A., Bioque, G., Estrela, J. M., Santangelo, F., Esteras, A., Llombart-Bosch, A., & Morcillo, E. J. (2001). Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats. *European Respiratory Journal*, 17(6), 1228–1235. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00049701>
31. Davis, G. S., Leslie, K. O., & Hemenway, D. R. (1998). Silicosis in mice: Effects of dose, time, and genetic strain. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 17(2), 81–97.
32. De Caro, L., Ghizzi, A., Costa, R., Longo, A., Ventresca, G. P., & Lodola, E. (1989). Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*, 39(3), 382–386.
33. Dekhuijzen, P. N. R. (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: Their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 23(4), 629–636. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00016804>
34. Derendorf, H., Nave, R., Drollmann, A., Cerasoli, F., & Wurst, W. (2006). Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *European Respiratory Journal*, 28(5), 1042–1050. <https://doi.org/10.1183/09031936.00074905>
35. Desai, O., Winkler, J., Minasyan, M., & Herzog, E. L. (2018). The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 5, 43. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00043>
36. Diaz, J. C., Palavecino, T., Pereira, G., Díaz, J. C., Palavecino, T., & Pereira, G. (2019). Tomografía computada de alta resolución en el diagnóstico de la fibrosis pulmonar idiopática. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 35(4), 268–274. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482019000400268>
37. Dickinson, D. A., Moellering, D. R., Iles, K. E., Patel, R. P., Levonen, A.-L., Wigley, A., Darley-Usmar, V. M., & Forman, H. J. (2003). Cytoprotection against Oxidative Stress and the Regulation of Glutathione Synthesis. *384(4)*, 527–537. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.061>
38. Drent, M., Cobben, N. A., Henderson, R. F., Wouters, E. F., & Dieijen-Visser, M. van. (1996). Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *European Respiratory Journal*, 9(8), 1736–1742. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09081736>
39. Eftekhari, P., Hajzadeh, S., Raoufy, M. R., Masjedi, M. R., Yang, M., Hansbro, N., Li, J. J., & Foster, P. S. (2013). Preventive effect of N-acetylcysteine in a mouse model of steroid resistant acute exacerbation of asthma. *EXCLI Journal*, 12, 184–192.
40. Geneser. (1985). *Color Atlas of Histology*.
41. Hagiwara, S.-I., Ishii, Y., & Kitamura, S. (2000). Aerosolized Administration of N-Acetylcysteine Attenuates Lung

- Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(1), 225–231. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.1.9903129>
42. Hamedinasab, H., Rezayan, A. H., Mellat, M., Mashreghi, M., & Jaafari, M. R. (2020). Development of chitosan-coated liposome for pulmonary delivery of N-acetylcysteine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1455–1463. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.190>
 43. Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*, 43(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>
 44. Harada, M., Hirota, T., Jodo, A. I., Hitomi, Y., Sakashita, M., Tsunoda, T., Miyagawa, T., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Masuko, H., Sakamoto, T., Hizawa, N., Suzuki, Y., Yoshihara, S., Adachi, M., ... Tamari, M. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Gene Promoter Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(6), 787–793. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0418OC>
 45. Hodgson, U., Laitinen, T., & Tukiainen, P. (2002). Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, 57(4), 338–342. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.4.338>
 46. Holgate, S. T. (2008). Pathogenesis of Asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(6), 872–897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x>
 47. Holgate, S. T., & Douglass, J. A. (2013). *Fast Facts: Asthma*. Karger Medical and Scientific Publishers.
 48. Hoshino, M., & Ohtawa, J. (2012). Effects of Adding Omalizumab, an Anti-Immunoglobulin E Antibody, on Airway Wall Thickening in Asthma. *Respiration*, 83(6), 520–528. <https://doi.org/10.1159/000334701>
 49. Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, 11(6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>
 50. Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G., & Visvikis, S. (2002). Growing Significance of Myeloperoxidase in Non-infectious Diseases. 40(1), 2–8. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.002>
 51. Hubbard, R. (2001). Occupational dust exposure and the aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *European Respiratory Journal*, 18(32 suppl), 119s–121s.
 52. Hübner, R.-H., Gitter, W., El Mokhtari, N. E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S., & Bewig, B. (2008). Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*, 44(4), 507–511, 514–517. <https://doi.org/10.2144/000112729>
 53. Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R., & McKeever, T. (2015). Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review. *European Respiratory Journal*, 46(3), 795–806. <https://doi.org/10.1183/09031936.00185114>
 54. Jain, A. K., Chalasani, K. B., Khar, R. K., Ahmed, F. J., & Diwan, P. V. (2007). Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of Drug Targeting*, 15(6), 417–427. <https://doi.org/10.1080/10611860701453653>
 55. John Wiley & Sons. (1980). *Liposomes in Biological Systems*.
 56. Jo-Watanabe, A., Okuno, T., & Yokomizo, T. (2019). The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/ijms20143580>
 57. Kan, S., Hariyadi, D. M., Grainge, C., Knight, D. A., Bartlett, N. W., & Liang, M. (2020). Airway epithelial-targeted nanoparticles for asthma therapy. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 318(3), L500–L509. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00237.2019>
 58. Katzenstein, Mukhopadhyay, & Myers. (2008). Diagnosis of usual interstitial pneumonia and distinction from other fibrosing interstitial lung diseases. *Human Pathology*, 39(9). <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.05.009>
 59. Kinoshita, T., & Goto, T. (2019). Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrogenesis and Its Progression to Lung Cancer: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1461. <https://doi.org/10.3390/ijms20061461>
 60. Konduri, K. S., Nandedkar, S., Rickaby, D. A., Düzgüneş, N., & Gangadharam, P. R. J. (2005). The Use of Sterically Stabilized Liposomes to Treat Asthma. In *Methods in Enzymology* (Vol. 391, pp. 413–427). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91023-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91023-9)
 61. Korsgaard, J., & Ledet, M. (2009). Potential side effects in patients treated with inhaled corticosteroids and long-acting β_2 -agonists. *Respiratory Medicine*, 103(4), 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.10.028>
 62. Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1916, 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
 63. Kulshrestha, R., Pandey, A., Jaggi, A., & Bansal, S. (2020). Beneficial effects of N-acetylcysteine on

- protease-antiprotease balance in attenuating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(3), 396–405. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2020.39031.9261>
64. Lamas, D. J., Kawut, S. M., Bagiella, E., Philip, N., Arcasoy, S. M., & Lederer, D. J. (2011). Delayed Access and Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(7), 842–847. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0668OC>
 65. Lancheros, R., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2018). Improvement of N-Acetylcysteine Loaded in PLGA Nanoparticles by Nanoprecipitation Method. *Journal of Nanotechnology*, 2018, e3620373. <https://doi.org/10.1155/2018/3620373>
 66. Law, S. L., Huang, K. J., Chou, V. H., & Cherng, J. Y. (2001). Enhancement of nasal absorption of calcitonin loaded in liposomes. *Journal of Liposome Research*, 11(2–3), 165–174. <https://doi.org/10.1081/LPR-100108460>
 67. Lee, B.-S., Margolin, S. B., & Nowak, R. A. (1998). Pirfenidone: A Novel Pharmacological Agent That Inhibits Leiomyoma Cell Proliferation and Collagen Production. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(1), 219–223. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.1.4503>
 68. Lee, P.-H., Hong, J., & Jang, A.-S. (2020). N-acetylcysteine decreases airway inflammation and responsiveness in asthma by modulating claudin 18 expression. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 35(5), 1229–1237. <https://doi.org/10.3904/kjim.2019.105>
 69. Lee, V. H., Yamamoto, A., & Kompella, U. B. (1991). Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 8(2), 91–192.
 70. Liu, T., De Los Santos, F. G., & Phan, S. H. (2017). The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. In L. Rittié (Ed.), *Fibrosis: Methods and Protocols* (pp. 27–42). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2
 71. Mayer, L. D., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 858(1), 161–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90302-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90302-0)
 72. Mazzeo, V. (2021). La mortalidad entre siglos por enfermedades respiratorias en la Ciudad de Buenos Aires. ¿Las muertes por pandemias del siglo XXI las superaron? 18.
 73. McGregor, M. C., Krings, J. G., Nair, P., & Castro, M. (2019). Role of Biologics in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(4), 433–445. <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1944CI>
 74. McTavish, D., Goa, K. L., & Ferrill, M. (1990). Terfenadine. *Drugs*, 39(4), 552–574. <https://doi.org/10.2165/00003495-199039040-00006>
 75. Mei, Q., Liu, Z., Zuo, H., Yang, Z., & Qu, J. (2022). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.797292>
 76. Menardo, J.-L., Horak, F., Danzig, M. R., & Czarlewski, W. (1997). A review of loratadine in the treatment of patients with allergic bronchial asthma. *Clinical Therapeutics*, 19(6), 1278–1293. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(97\)80005-7](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(97)80005-7)
 77. Merkus, F. W., Verhoef, J. C., Schipper, N. G., & Marttin, E. (1998). Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1–2), 13–38. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00059-8](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00059-8)
 78. Mitsopoulos, P., & Suntres, Z. E. (2011). Protective Effects of Liposomal N-Acetylcysteine against Paraquat-Induced Cytotoxicity and Gene Expression. *Journal of Toxicology*, 2011, e808967. <https://doi.org/10.1155/2011/808967>
 79. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gaudie, J., & Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 362–382. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.011>
 80. Moore, B. B., & Hogaboam, C. M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), L152–L160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>
 81. Mortimer, K. M., Bartels, D. B., Hartmann, N., Capapey, J., Yang, J., Gately, R., & Enger, C. (2020). Characterizing Health Outcomes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis using US Health Claims Data. *Respiration*, 99(2), 108–118. <https://doi.org/10.1159/000504630>
 82. Muramatsu, K., Maitani, Y., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). The relationship between the rigidity of the liposomal membrane and the absorption of insulin after nasal administration of liposomes modified with an enhancer containing insulin in rabbits. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(10), 1099–1105. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102275>
 83. Murdoch, J. R., & Lloyd, C. M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1), 24–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005>
 84. Nag, K., Hillier, A., Parsons, K., & Garcia, M. F. (2007). Interactions of serum with lung surfactant extract in the

- bronchiolar and alveolar airway models. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 157(2), 411–424. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.02.001>
85. Navath, R. S., Kurtoglu, Y. E., Wang, B., Kannan, S., Romero, R., & Kannan, R. M. (2008). Dendrimer–Drug Conjugates for Tailored Intracellular Drug Release Based on Glutathione Levels. *Bioconjugate Chemistry*, 19(12), 2446–2455. <https://doi.org/10.1021/bc800342d>
 86. Newton, R. (2014). Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. *European Journal of Pharmacology*, 724, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.05.035>
 87. Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Glassberg, M. K., Kardatzke, D., King, T. E., Lancaster, L., Sahn, S. A., Szwarzberg, J., Valeyre, D., & Bois, R. M. du. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials. *The Lancet*, 377(9779), 1760–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60405-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60405-4)
 88. Okusanya, Ó. O., Bhavnani, S. M., Hammel, J., Minic, P., Dupont, L. J., Forrest, A., Mulder, G.-J., Mackinson, C., Ambrose, P. G., & Gupta, R. (2009). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Liposomal Amikacin for Inhalation in Cystic Fibrosis Patients with Chronic Pseudomonas Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3847–3854. <https://doi.org/10.1128/AAC.00872-08>
 89. Olivier, K. N., Griffith, D. E., Eagle, G., McGinnis, J. P., Micioni, L., Liu, K., Daley, C. L., Winthrop, K. L., Ruoss, S., Addrizzo-Harris, D. J., Flume, P. A., Dorgan, D., Salathe, M., Brown-Elliott, B. A., Gupta, R., & Wallace, R. J. (2017). Randomized Trial of Liposomal Amikacin for Inhalation in Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(6), 814–823. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0700OC>
 90. Olsson, B., Johansson, M., Gabrielsson, J., & Bolme, P. (1988). Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 34(1), 77–82. <https://doi.org/10.1007/bf01061422>
 91. Omara, F. O., Blakley, B. R., Bernier, J., & Fournier, M. (1997). Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro. *Toxicology*, 116(1), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(96\)03520-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(96)03520-2)
 92. Ourique, A. F., Chaves, P. dos S., Souto, G. D., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Beck, R. C. R. (2014). Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.017>
 93. Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nri2735>
 94. Peters, S. G., McDougall, J. C., Douglas, W. W., Coles, D. T., & DeRemee, R. A. (1993). Colchicine in the Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Chest*, 103(1), 101–104. <https://doi.org/10.1378/chest.103.1.101>
 95. Peters, S. P., Ferguson, G., Deniz, Y., & Reisner, C. (2006). Uncontrolled asthma: A review of the prevalence, disease burden and options for treatment. *Respiratory Medicine*, 100(7), 1139–1151. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.03.031>
 96. Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: How, why and what for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 12(3), 288–311. <https://doi.org/10.18433/j3nc79>
 97. Pradhan, B., Kumar, N., Saha, S., & Roy, A. (2015). Liposome: Method of preparation, advantages, evaluation and its application. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, 3(3), Article 3.
 98. Prishchepa, I. V., & Landyshev, I. S. (1997). [The effect of the liposomal form of hydrocortisone on the status of cellular and humoral immunity in patients with steroid-dependent bronchial asthma]. *Terapevticheskii arkhiv*, 69(3), 39–42.
 99. Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., Colby, T. V., Cordier, J.-F., Flaherty, K. R., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., ... Schönemann, H. J. (2011). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(6), 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
 100. Rice, J. B., White, A. G., Scarpati, L. M., Wan, G., & Nelson, W. W. (2017). Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. *Clinical Therapeutics*, 39(11), 2216–2229. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.09.011>
 101. Richeldi, L., Collard, H. R., & Jones, M. G. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 389(10082), 1941–1952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30866-8)
 102. Richeldi, L., Costabel, U., Selman, M., Kim, D. S., Hansell, D. M., Nicholson, A. G., Brown, K. K., Flaherty, K. R., Noble, P. W., Raghu, G., Brun, M., Gupta, A., Juhel, N., Klüglich, M., & du Bois, R. M. (2011). Efficacy of a

- Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 365(12), 1079–1087. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103690>
103. Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery*, 4(4), 297–305.
 104. Serrano-Mollar, A., Closa, D., Prats, N., Blesa, S., Martinez-Losa, M., Cortijo, J., Estrela, J. M., Morcillo, E. J., & Bulbena, O. (2003). In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *British Journal of Pharmacology*, 138(6), 1037–1048. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705138>
 105. Shukla, S. D., Swaroop Vanka, K., Chavelier, A., Shastri, M. D., Tambuwala, M. M., Bakshi, H. A., Pabreja, K., Mahmood, M. Q., & O'Toole, R. F. (2020). Chronic respiratory diseases: An introduction and need for novel drug delivery approaches. *Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems*, 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820658-4.00001-7>
 106. Song, J., Yao, L., Shi, J., Li, J., & Xu, C. (2021). Protective effects of N-acetylcysteine on a chemical-induced murine model of asthma. *Journal of Asthma*, 58(9), 1208–1215. <https://doi.org/10.1080/02770903.2020.1781166>
 107. Soto, A. S., Fenoy, I. M., Sanchez, V. R., March, F., Sibilia, M. D. P., Aldirico, M. de los A., Picchio, M. S., Arcon, N., Acosta, P. L., Polack, F. P., Martin, V., & Goldman, A. (2017). *Toxoplasma gondii* serine-protease inhibitor-1: A new adjuvant candidate for asthma therapy. *PLOS ONE*, 12(10), e0187002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187002>
 108. Soto, A., Sibilia, M. P., Sánchez, V. R., Arcón, N., Martin, V., Fenoy, I. M., & Goldman, A. (2022). Contribution of Kazal-Like Domains of the Serine Protease Inhibitor-1 from *Toxoplasma gondii* in Asthma Therapeutic Vaccination Effectiveness. *International Archives of Allergy and Immunology*, 183(5), 471–478. <https://doi.org/10.1159/000520796>
 109. Sozzi, G., Veronese, M. L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M. G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M. A., Ohta, M., Huebner, K., & Croce, C. M. (1996). The FHIT Gene at 3p14.2 Is Abnormal in Lung Cancer. *Cell*, 85(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81078-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81078-8)
 110. Sun, T., Liu, J., & Zhao, D. W. (2016). Efficacy of N-Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicine*, 95(19), e3629. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003629>
 111. Tattersall, A. B., Bridgman, K. M., & Huitson, A. (1983). Acetylcysteine (Fabrol) in Chronic Bronchitis—A Study in General Practice. *Journal of International Medical Research*, 11(5), 279–284. <https://doi.org/10.1177/030006058301100505>
 112. Teixeira, K. C., Soares, F. S., Rocha, L. G. C., Silveira, P. C. L., Silva, L. A., Valença, S. S., Pizzol, F. D., Streck, E. L., & Pinho, R. A. (2008). Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21(2), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.07.006>
 113. Thangam, E. B., Jemima, E. A., Singh, H., Baig, M. S., Khan, M., Mathias, C. B., Church, M. K., & Saluja, R. (2018). The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01873>
 114. Uematsu, K., Yoshimura, A., Gemma, A., Mochimaru, H., Hosoya, Y., Kunugi, S., Matsuda, K., Seike, M., Kurimoto, F., Takenaka, K., Koizumi, K., Fukuda, Y., Tanaka, S., Chin, K., Jablons, D. M., & Kudoh, S. (2001). Aberrations in the Fragile Histidine Triad (FHIT) Gene in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cancer Research*, 61(23), 8527–8533.
 115. van Rooijen, N., & van Nieuwmege, R. (1980). Liposomes in Immunology: Multilamellar Phosphatidylcholine Liposomes as a Simple, Biodegradable and Harmless Adjuvant Without any Immunogenic Activity of its own. *Immunological Communications*, 9(3), 243–256. <https://doi.org/10.3109/08820138009065997>
 116. Walters, D. M., & Kleeberger, S. R. (2008). Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 40(1), 5.46.1-5.46.17. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0546s40>
 117. Williams, D. M. (2018). Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respiratory Care*, 63(6), 655–670. <https://doi.org/10.4187/respcare.06314>
 118. Wolters, P. J., Blackwell, T. S., Eickelberg, O., Loyd, J. E., Kaminski, N., Jenkins, G., Maher, T. M., Molina-Molina, M., Noble, P. W., Raghu, G., Richeldi, L., Schwarz, M. I., Selman, M., Wuyts, W. A., & Schwartz, D. A. (2018). Time for a change: Is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic? *The Lancet. Respiratory Medicine*, 6(2), 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30007-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30007-9)
 119. Xia, Y., Kelton, C. M. L., Xue, L., Guo, J. J., Bian, B., & Wigle, P. R. (2013). Safety of long-acting beta agonists and inhaled corticosteroids in children and adolescents with asthma. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 4(6), 254–263. <https://doi.org/10.1177/2042098613504124>
 120. Yamauchi, K., & Ogasawara, M. (2019). The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the

- Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms20071733>
121. Yildirim, Z., Kotuk, M., Iraz, M., Kuku, I., Ulu, R., Armutcu, F., & Ozen, S. (2005). Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: Erdosteine and N-acetylcysteine. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 18(5), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2005.02.001>
122. Yokomizo, T., Nakamura, M., & Shimizu, T. (2018). Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(7), 2691–2701. <https://doi.org/10.1172/JCI97946>
123. Zappia, C. D., Soto, A., Granja-Galeano, G., Fenoy, I., Fernandez, N., Davio, C. A., Shayo, C., Fitzsimons, C. P., Goldman, A., & Monczor, F. (2019). Azelastine potentiates antiasthmatic dexamethasone effect on a murine asthma model. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00531. <https://doi.org/10.1002/prp2.531>
124. Zimprich, A., Garrett, L., Deussing, J. M., Wotjak, C. T., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M. H., Wurst, W., & Hölter, S. M. (2014). A robust and reliable non-invasive test for stress responsivity in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 125. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00125>

Este texto corresponde a la versión final de tesis de licenciatura titulada “Potencial terapéutico de una formulación liposomal de N-acetilcisteína en modelos murinos de enfermedades respiratorias”

Autor/a: Estefanía Nicole Morales

Director: Dr. Ignacio Martín Fenoy

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Morales', with a long horizontal stroke extending to the right.

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'I. Martín Fenoy', with a long horizontal stroke extending to the right.